

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 11 月 29 日 (29.11.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/90362 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/40, (72) 発明者; および
C07K 14/08, 16/10, C12N 5/10, C12P 21/02, A01H 5/00, (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 笹谷 幸英
C12Q 1/68, G01N 33/50 (SASAYA, Takahide) [JP/JP]; 〒765-0003 香川県普
通寺市普通寺町7-12-14 Kagawa (JP). 小金澤 碩城
(KOGANEZAWA, Hiroki) [JP/JP]; 〒721-0975 広島県
福山市西深津町6-11-2-402 Hiroshima (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/04268
- (22) 国際出願日: 2001 年 5 月 22 日 (22.05.2001)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: (74) 代理人: 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒
特願2000-154440 2000 年 5 月 22 日 (22.05.2000) JP 300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階
特願2001-65339 2001 年 3 月 8 日 (08.03.2001) JP Ibaraki (JP).
- (81) 指定国 (国内): JP, US.
- (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (DE, ES, GB).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独
立行政法人農業技術研究機構 (NATIONAL AGRI-
CULTURAL RESEARCH ORGANIZATION) [JP/JP];
〒305-8517 茨城県つくば市観音台3-1-1 Ibaraki (JP).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NUCLEIC ACIDS ENCODING LETTUCE BIG-VEIN VIRUS PROTEINS AND UTILIZATION THEREOF

WO 01/90362 A1

(54) 発明の名称: レタスピッグベインウイルスタンパク質をコードする核酸およびその利用

(57) Abstract: A coat protein is purified from highly refined lettuce big-vein virus and a partial amino acid sequence thereof is determined. By a polymerase chain reaction with the use of primers which are designed based on the amino acid sequence data thus determined, an RNA encoding lettuce big-vein virus coat protein is cloned and its primary structure is clarified. By effecting 3'RACE and 5'RACE with the use of primers which are designed on the basis of the sequence data thus obtained, RNA molecules of plural proteins encoded by lettuce big-vein virus are further isolated and the primary structures thereof are successfully determined. Similarly, an RNA encoding lettuce big-vein virus polymerase is successfully isolated and its primary structure is determined. Thus, it is found out that a lettuce big-vein virus-tolerant lettuce species might be constructed and the infection with lettuce big-vein virus might be diagnosed by using the above data.

[続葉有]



(57) 要約:

高度に純化したレタスビッグベインウイルスからその外被タンパク質を精製し、その部分アミノ酸配列を決定した。決定したアミノ酸配列の情報を基に設計したプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応により、レタスビッグベインウイルス外被タンパク質をコードする RNA をクローニングし、その一次構造を解明した。得られた配列情報を基に設計したプライマーを用いた 3' RACE および 5' RACE を実施することにより、更に、レタスビッグベインウイルスがコードする複数のタンパク質の RNA 分子を単離するとともに、その一次構造を決定することに成功した。同様に、レタスビッグベインウイルスのポリメラーゼをコードする RNA も単離することに成功し、その一次構造を決定した。これらを利用してレタスビッグベインウイルス抵抗性レタスの作出およびレタスビッグベインウイルスの感染の診断を行なうことが可能であることを見出した。

明細書

レタスビッグベインウイルスタンパク質をコードする核酸およびその利用

技術分野

本発明は、レタスビッグベインウイルスタンパク質をコードする核酸および該核酸によりコードされるタンパク質、並びにそれらの製造および用途に関する。

背景技術

レタスビッグベインウイルス (LBVV) は *Varicosavirus* に属するウイルスで、7.0kb と 6.5kb の 2 本の RNA からなり、48kDa の外被タンパクを保持している。レタスビッグベインウイルスは、*Olipidum brassicae* によって土壌伝搬する土壌伝搬性ウイルスで、アメリカ、オーストラリア、ニュージーランド、日本、ヨーロッパで発生している。該ウイルスはレタスに感染して、その品質および収量を著しく低下させるため、レタスの生産において大きな問題となっている。

残念ながら現在までにレタスの該ウイルスに対する抵抗性遺伝子の存在は報告されていない。アントレー、シーグリーンおよびパシフィックなど数品種は LBVV 抵抗性品種として市販されているものの、その抵抗性は低い。従って、レタスビッグベインウイルスによる病害に対しては、根本的な解決策が見出されていないのが現状である。

レタスビッグベインウイルスによる病害を防止するためには、その遺伝子情報の解明が重要なステップとなる。しかしながら、レタスビッグベインウイルスは、ウイルス粒子が不安定である、ウイルス粒子同士が容易にアグリゲーションを起こす、植物体中でのウイルス濃度が極めて低いなどの理由から純化精製が極めて困難である。現在まで、該ウイルスに対する純化の成功例は 2 例 (S.Kuwata *et al.*, (1983), 日植病報, 49, 246-251、H.J.Vetten *et al.*, (1987), Journal o

f Phytopathology, 120, 53-59) 報告されているものの、再現性が低く純化量も極めて低い。このため、レタスビッグベインウイルスに関しては遺伝子情報の解明は全く行われていない。

発明の開示

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、レタスビッグベインウイルスタンパク質および該タンパク質をコードする核酸を単離し、その構造を解明することを目的とする。また、本発明は、レタスにおける該核酸またはそのアンチセンスの発現を通じて、レタスにレタスビッグベインウイルスに対する抵抗性を付与することを目的とする。さらに、本発明は、該核酸あるいは該核酸によりコードされるタンパク質を検出することによるレタスビッグベインウイルスの感染を診断する方法を提供することも目的とする。

レタスビッグベインウイルスは RNA ウイルスであり、該ウイルスのタンパク質をコードする DNA またはそのアンチセンス DNA を植物体内で発現させれば、転写レベルあるいは翻訳レベルでレタスビッグベインウイルスタンパク質の産生や機能を阻害することができると考えられる (P.F.Tennant *et al.*, (1994), *Phytopathology*, 84, 1359-1366、C.C.Huntley & T.C.Hall, (1993), *Virology*, 192, 290-297)、D.C.Baulcombe, (1996), *The Plant Cell*, 8, 1833-1844)。

本発明者等は、このような発想に着目してレタスビッグベインウイルスに対する抵抗性レタスを作製するため、レタスビッグベインウイルスタンパク質をコードする遺伝子の単離を行なった。

具体的には、本発明者らは、まず、レタスビッグベインウイルスを高度に純化し、これを SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に付し、該ウイルスを構成する外被タンパク質を検出した。この検出された外被タンパク質を精製し、ペプチドに分解後エドマン法によりその部分のアミノ酸配列を決定した。さらに、決定したアミノ酸配列の情報を基に設計したプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反

応 (PCR) により、レタスビッグベインウイルス外被タンパク質をコードする RNA をクローニングし、その塩基配列を決定した。

次いで、レタスビッグベインウイルスの全外被タンパク質をコードする遺伝子を決定するために、純化ウイルスおよび該ウイルスが感染し明瞭な感染症状を示した葉から RNA を調製し、この RNA 分子を用いて 3' RACE あるいは 5' RACE を実施した。その結果、レタスビッグベインウイルス外被タンパク質をコードする RNA 分子を単離するとともに、その一次構造を決定することに成功した。さらに、ゲノムウォーキング法により、他の 4 種のレタスビッグベインウイルスタンパク質をコードする RNA 分子を単離するとともに、その一次構造を決定することにも成功した。

同様に、本発明者らは、高度に純化したレタスビッグベインウイルスからポリメラーゼタンパク質をコードする RNA 分子を単離することにも成功した。

単離した RNA 分子またはそのアンチセンス分子は、その発現によりレタス植物体にレタスビッグベインウイルス抵抗性を付与することが可能であり、これによりレタスの生産性の向上を図ることができる。また、単離した RNA 分子の配列情報を基にレタスビッグベインウイルス特異的プライマーを設計し、これを利用することによりレタスビッグベインウイルスの遺伝診断を行うことも可能である。また、得られた配列情報を基に、レタスビッグベインウイルスタンパク質に結合する抗血清を作製して、これをレタスビッグベインウイルスの血清学的診断法に利用することも可能である。

本発明は、以上のような知見を基に完成されたものであり、レタスビッグベインウイルスタンパク質および該タンパク質をコードする核酸、並びにそれらの製造および用途を提供する。

より詳しくは、本発明は、

(1) レタスビッグベインウイルスのタンパク質をコードする下記 (a) または (b) の核酸、

(a) 配列番号：2 から 6、または 1 3 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする核酸。

(b) 配列番号：1 または 1 2 に記載の塩基配列のコード領域を含む、(a) に記載の核酸。

(2) RNA である、(1) に記載の核酸、

(3) DNA である、(1) に記載の核酸、

(4) (2) に記載の核酸の相補鎖に相補的なセンス RNA をコードする DNA、

(5) (2) に記載の核酸と相補的なアンチセンス RNA をコードする DNA、

(6) (2) に記載の核酸を特異的に開裂するリボザイム活性を有する RNA をコードする DNA、

(7) (3) に記載の核酸を含むベクター、

(8) (3) に記載の核酸または (7) に記載のベクターを保持する形質転換細胞、

(9) (1) に記載の核酸によりコードされるタンパク質、

(10) (9) に記載のタンパク質に結合する抗体、

(11) (8) に記載の形質転換細胞を培養し、該形質転換細胞またはその培養上清から発現させたタンパク質を回収する工程を含む、(9) に記載のタンパク質の製造方法、

(12) (4) から (6) のいずれかに記載の DNA を含むベクター、

(13) (1) に記載の核酸、(4) から (6) のいずれかに記載の DNA、または (7) もしくは (12) に記載のベクターを保持する形質転換レタス細胞、

(14) (13) に記載の形質転換レタス細胞を含む形質転換レタス植物体、

(15) (14) に記載の形質転換レタス植物体の子孫またはクローンである、形質転換レタス植物体、

(16) (14) または (15) に記載の形質転換レタス植物体の繁殖材料、および

(17) レタスビッグベインウイルスの感染を診断する方法であって、レタス細胞またはレタスビッグベインウイルスの媒介菌である *Olpidium brassicae* あるいは本媒介菌を含む土壌における、(1) に記載の核酸または (9) に記載のタンパク質を検出することを特徴とする方法、を提供するものである。

本発明は、レタスビッグベインウイルスのタンパク質および該タンパク質をコードする核酸を提供する。本発明に含まれる、本発明者らにより単離されたレタスビッグベインウイルスのタンパク質をコードする cDNA の塩基配列を配列番号：1 に、該 cDNA がコードするタンパク質のアミノ酸配列を配列番号：2 から 6 に示した。単離した cDNA は、6078bp の塩基配列からなり、5 つのタンパクをコードした。タンパク 1 (外被タンパク質；実施例 1) は 209 塩基より翻訳がスタートして 397 のアミノ酸をコードし (単離したクローンを「LBVV-cp」と命名した／配列番号：2)、タンパク 2 (実施例 3) は 1492 塩基より翻訳がスタートして 333 のアミノ酸をコードし (配列番号：3)、タンパク 3 (実施例 3) は 2616 塩基より翻訳がスタートして 290 のアミノ酸をコードし (配列番号：4)、タンパク 4 (実施例 3) は 3842 塩基より翻訳がスタートして 164 のアミノ酸をコードし (配列番号：5)、タンパク 5 (実施例 3) は 4529 塩基より翻訳がスタートして 368 のアミノ酸をコードしていた (配列番号：6)。

また、同じく本発明に含まれる、本発明者らにより単離されたレタスビッグベインウイルスのポリメラーゼをコードする cDNA の塩基配列 (実施例 4) を配列番号：12 に、該 cDNA がコードするタンパク質のアミノ酸配列を配列番号：13 に示した (単離したクローンを「LBVV-L」と命名した)。単離した cDNA は 6793bp の塩基配列からなり、337 塩基目より翻訳がスタートして 2040 のアミノ酸をコードしていた。

本発明者らは、さらに、レタスビッグベインウイルスが、一鎖の RNA ウイルスであり、粒子内に多少の+鎖も含むことを明らかにした。

これはレタスビッグベインウイルスの遺伝子およびタンパク質の一次構造を示した初めての例である。

本発明の LBVV-cp タンパク質 (LBVV タンパク 1)、LBVV タンパク 2～5 タンパク質、または LBVV-L タンパク質をコードする核酸には、DNA および RNA が含まれる。この DNA には cDNA および化学合成 DNA が含まれ、また、RNA にはウイルスゲノム RNA、mRNA、合成 RNA が含まれる。本発明の核酸は、当業者にとって常套手段を利用して調製することが可能である。具体的には、純化ウイルスを SDS-フェノール法などの方法で除タンパク質して調製した RNA、あるいは CTAB 法などでウイルス感染葉から抽出した全核酸を鋳型として、本発明の核酸の配列から設計したプライマーあるいはランダムプライマーを用いて逆転写反応を行なうことで第一鎖 DNA を合成できる。この方法で作製した第一鎖 DNA から、Gubler & Hoffman 法 (U.Gulber & B.J.Hoffman, (1983), Gene 25, 263-269) により第二鎖 DNA を合成し、市販の数々のプラスミドあるいはファージミドベクターにクローニングできる。あるいは、第一鎖 DNA を鋳型とし、本発明の核酸の配列から設計したプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応により該ウイルスの RNA をコードする DNA を増幅し、pGEM®-T ベクターなどを用いた TA クローニング、あるいはプライマーに制限酵素サイトを付けることにより市販の数々のプラスミドベクターにクローニングできる。

本発明の核酸は、組換えタンパク質の調製やレタスビッグベインウイルス抵抗性レタスの作出に利用することもできる。

組換えタンパク質を調製する場合には、通常、本発明のタンパク質をコードする DNA を適当な発現ベクターに挿入し、該ベクターを適当な細胞に導入し、形質転換細胞を培養して発現させたタンパク質を精製する。組換えタンパク質は、精製を容易にするなどの目的で、他のタンパク質との融合タンパク質として発現さ

せることも可能である。例えば、大腸菌を宿主としてマルトース結合タンパク質との融合タンパク質として調製する方法（米国 New England BioLabs 社発売のベクター pMAL シリーズ）、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として調製する方法（Amersham Pharmacia Biotech 社発売のベクター pGEX シリーズ）、ヒスチジンタグを付加して調製する方法（Novagen 社の pET シリーズ）などを利用することが可能である。宿主細胞としては、組換えタンパク質の発現に適した細胞であれば特に制限はなく、上記の大腸菌の他、発現ベクターを変えることにより、例えば、酵母、種々の動植物細胞、昆虫細胞などを用いることが可能である。宿主細胞へのベクターの導入には、当業者に公知の種々の方法を用いることが可能である。例えば、大腸菌への導入には、カルシウムイオンを利用した導入方法（M.Mandel, & A.Higa, (1970), Journal of Molecular Biology, 53, 158-162、D.Hanahan, (1983), Journal of Molecular Biology, 166, 557-580）を用いることができる。宿主細胞内で発現させた組換えタンパク質は、該宿主細胞またはその培養上清から、当業者に公知の方法により精製し、回収することができる。組換えタンパク質を上記したマルトース結合タンパク質などとの融合タンパク質として発現させた場合には、容易にアフィニティー精製を行うことが可能である。

得られた組換えタンパク質を用いれば、これに結合する抗体を調製することができる。例えば、ポリクローナル抗体は、精製した本発明のタンパク質若しくはその一部のペプチドをウサギなどの免疫動物に免疫し、一定期間の後に血液を採取し、血べいを除去した血清より調製することが可能である。また、モノクローナル抗体は、上記タンパク質若しくはペプチドで免疫した動物の抗体産生細胞と骨腫瘍細胞とを融合させ、目的とする抗体を産生する単一クローンの細胞（ハイブリドーマ）を単離し、該細胞から抗体を得ることにより調製することができる。これにより得られた抗体は、本発明のタンパク質の精製や検出などに利用するこ

とが可能である。本発明の抗体には、抗血清、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、およびこれら抗体の断片が含まれる。

レタスビッグベインウイルス抵抗性レタスの作出する場合には、レタスビッグベインウイルスタンパク質の産生や機能を抑制する DNA をレタス細胞に導入し、これにより得られた形質転換レタス細胞を再生させればよい。

レタスビッグベインウイルスタンパク質の産生や機能を抑制する DNA としては、レタスビッグベインウイルスタンパク質をコードする RNA のいずれかの鎖（センス鎖またはその相補鎖）にハイブリダイズする RNA をコードする DNA を用いることができる。

ウイルスゲノムのセンス鎖および mRNA にハイブリダイズする RNA をコードする DNA としては、本発明者らにより単離された配列番号：2 から 6、または 1 3 のいずれかに記載のタンパク質をコードする DNA（好ましくは配列番号：1 または 1 2 に記載の塩基配列のコード領域を含む DNA）の転写産物に相補的なアンチセンス RNA をコードする DNA が挙げられる。ここで「相補的」とは、レタスビッグベインウイルスタンパク質の産生を有効に阻害できる限り、完全に相補的でない場合も含まれる。転写された RNA は、標的とするレタスビッグベインウイルスタンパク質をコードする RNA に対して好ましくは 90% 以上、最も好ましくは 95% 以上の相補性を有する。ここで「相補性」とは、2 つの配列の対応する領域を、相補的塩基対の数が最大となるように整列させた場合における、該領域における全塩基数に対する相補的塩基対を形成した塩基数の % である。

ウイルスゲノム RNA の相補鎖にハイブリダイズする RNA をコードする DNA としては、本発明者らにより単離された配列番号：2 から 6、または 1 3 のいずれかに記載のタンパク質をコードする RNA（好ましくは配列番号：1 または 1 2 に記載の塩基配列のコード領域を含む RNA）の相補鎖に相補的なセンス RNA をコードする DNA を用いることができる。ここで「相補的」とは、レタスビッグベインウイルスタンパク質の産生を有効に阻害できる限り、完全に相補的でない場合も含

まれる。転写されたセンス RNA は、標的とするレタスビッグベインウイルススタンパク質をコードする RNA（相補鎖）に対して好ましくは 90%以上、最も好ましくは 95%以上の相補性を有する。

効果的に標的遺伝子の発現を阻害するには、上記アンチセンス RNA やセンス RNA の長さは、少なくとも 15 塩基以上であり、好ましくは 100 塩基以上であり、さらに好ましくは 500 塩基以上であり、通常、5kb よりも短く、好ましくは 2.5kb よりも短い。

また、レタスビッグベインウイルススタンパク質の産生を抑制する DNA としては、レタスビッグベインウイルススタンパク質をコードする RNA の少なくとも一方の鎖を切断するリボザイムをコードする DNA を用いることも可能であると考えられる。

リボザイムとは触媒活性を有する RNA 分子のことをいう。リボザイムには種々の活性を有するものがあるが、中でも RNA を切断する酵素としてのリボザイムの研究により、RNA の部位特異的な切断を目的とするリボザイムの設計が可能となった。リボザイムには、グループ I イントロン型や、RNaseP に含まれる M1RNA のように 400 ヌクレオチド以上の大きさのものもあるが、ハンマーヘッド型やヘアピン型と呼ばれる 40 ヌクレオチド程度の活性ドメインを有するものもある（小泉誠および大塚栄子，(1990)，蛋白質核酸酵素，35，2191-2200）。

例えば、ハンマーヘッド型リボザイムの自己切断ドメインは、G13U14C15 の C15 の 3' 側を切断するが、活性には U14 が 9 位の A と塩基対を形成することが重要とされ、15 位の塩基は C の他に A または U でも切断されることが示されている（M.Koizumi *et al.*, (1988), FEBS Letters, 228, 228-230）。リボザイムの基質結合部を標的部位近傍の RNA 配列と相補的になるように設計すれば、標的 RNA 中の UC、UU または UA という配列を認識する制限酵素的な RNA 切断リボザイムを作出することが可能である（M.Koizumi *et al.*, (1988), FEBS Letters, 239, 285、小泉誠および大塚栄子，(1990)，蛋白質核酸酵素，35，2191-2200、M.Koizumi *et al.*, (1989), Nucleic Acids Research, 17, 7059-7071)。例えば、LBVV-cp 遺

伝子、LBVV タンパク 2～5 遺伝子、または LBVV-L 遺伝子（配列番号：1 または 12）中には標的となりうる部位が複数存在する。

また、ヘアピン型リボザイムも、本発明の目的のために有用である。ヘアピン型リボザイムは、例えばタバコリングスポットウイルスのサテライト RNA のマイナス鎖に見出される(J.M.Buzayan *et al.*, (1986), *Nature*, 323, 349-353)。このリボザイムも、標的特異的な RNA 切断を起こすように設計できることが示されている(Y.Kikuchi & N.Sasaki, (1992), *Nucleic Acids Research*, 19, 6751-6775、菊池洋, (1992), *化学と生物*, 30, 112-118)。

標的を切断できるよう設計されたリボザイムは、植物細胞中で転写されるようにカリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーターなどのプロモーターおよび転写終結配列に連結される。しかし、その際、転写された RNA の 5' 末端や 3' 末端に余分な配列が付加されていると、リボザイムの活性が失われてしまうことがある。このようなとき、転写されたリボザイムを含む RNA からリボザイム部分だけを正確に切り出すために、リボザイム部分の 5' 側や 3' 側に、トリミングを行うためのシスに働く別のトリミングリボザイムを配置させることも可能である(K. Taira *et al.*, (1990), *Protein Eng.*, 3, 733-738、A.M.Dzianott & J.J.Bujarski, (1989), *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*, 86, 4823-4827、C.A.Grosshans & R.T.Cech, (1991), *Nucleic Acids Research*, 19, 3875-3880、K.Taira *et al.*, (1991), *Nucleic Acids Research*, 19, 5125-5130)。また、このような構成単位をタンデムに並べ、標的遺伝子内の複数の部位を切断できるようにして、より効果を高めることもできる(N.Yuyama *et al.*, (1992), *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 186, 1271-1279)。このようなりボザイムを用いて本発明で標的となる遺伝子の転写産物を特異的に切断し、該遺伝子の発現を抑制することができる。

レタス細胞の形質転換に用いられるベクターとしては、該細胞内で挿入された DNA を発現させることが可能なものであれば特に制限はない。例えば、レタス細胞内での恒常的な遺伝子発現を行うためのプロモーター（例えば、カリフラワー

モザイクウイルスの 35S プロモーター) を有するベクターや、外的な刺激により誘導的に活性化されるプロモーターを有するベクターを用いることも可能である。好適なベクターとしては、例えば、pBI バイナリーベクターが挙げられる。ベクターの導入される「レタス細胞」には、種々の形態のレタス細胞、例えば、懸濁培養細胞、プロトプラスト、葉の切片、カルスなどが含まれる。

レタス細胞へのベクターの導入は、ポリエチレングリコール法、ポリカチオン法、電気穿孔法 (エレクトロポレーション)、アグロバクテリウムを介する方法、パーティクルガン法など当業者に公知の種々の方法を用いることができる。例えば、文献 (S.Z.Pang *et al.*, (1996), The Plant Journal, 9, 899-909) に記載の方法は好適な方法の一例である。

形質転換レタス細胞からのレタス植物体の再生は、レタス細胞の種類に応じて当業者に公知の方法で行うことが可能である。好適な再生の方法としては、例えば、文献 (S.Enomoto, *et al.*, (1990), Plant Cell Reports, 9, 6-9) に記載の方法が挙げられる。

一旦、ゲノム内に本発明の DNA が導入された形質転換レタス植物体を得られれば、該植物体から有性生殖により子孫を得ることが可能である。また、該植物体やその子孫あるいはクローンから繁殖材料 (例えば、種子、株、カルス、プロトプラスト等) を得て、それらを基に該植物体を量産することも可能である。本発明には、本発明の DNA が導入された植物細胞、該細胞を含む植物体、該植物体の子孫およびクローン、並びに該植物体、その子孫、およびクロンの繁殖材料が含まれる。

また、本発明は、レタスビッグベインウイルスの感染を診断する方法を提供する。本発明の診断方法の一つの態様は、プライマーあるいはプローブを利用したレタスビッグベインウイルス RNA あるいは該ウイルスタンパク質をコードする RNA を検出することを特徴とする方法である。このようなプローブやプライマーとしては、配列番号：2 から 6、または 13 のいずれかに記載のレタスビッグベ

インウイルスタンパク質をコードする DNA に相同的または相補的な少なくとも 15 ヌクレオチドからなる核酸を用いることができる。該核酸は、好ましくは配列番号：2 から 6、または 13 のいずれかに記載のレタスビッグベインウイルスタンパク質をコードする DNA に特異的にハイブリダイズする核酸である。

プライマーやプローブは必要に応じて標識されていてもよい。標識としては、例えば、放射標識等が挙げられる。

この診断においては、例えば、レタスビッグベインウイルスに感染したことが疑われるレタス、該ウイルスを保毒していると疑われる *Olpidum*、あるいは本菌を含む土壌から被検試料を調製し、該試料に対し、上記のプライマーを用いた PCR 法あるいは上記のプローブを利用したノーザンブロッティング法を実施すればよい。

本発明の診断方法の他の一つの態様は、抗体を利用したレタスビッグベインウイルスタンパク質を検出することを特徴とする方法である。この診断に用いる抗体の調製は、例えば、得られたアミノ酸配列（配列番号：2 から 6、または 13 のいずれか）から抗原領域を推定してペプチドを合成し、KLH あるいは BSA などのキャリアタンパクに結合させ、これをウサギに免疫することにより調製することができる。また、QIAexpress Type IV Kit (QIAGEN 社)を用いて、大腸菌で発現させたレタスビッグベインウイルスのタンパク質をヒスチジンでタグgingし、得られたタンパク質をウサギに免疫することにより調製することもできる。抗体は、必要に応じて標識されていてもよい。標識としては、例えば、酵素標識等が挙げられる。また、抗体自体を直接標識しなくとも、抗体に結合する物質、例えば、プロテイン A などを介して標識して、目的のタンパク質を検出してもよい。

この診断においては、例えば、レタスビッグベインウイルスに感染したことが疑われるレタス、該ウイルスを保毒していると疑われる *Olpidum*、あるいは本菌を含む土壌から被検試料を調製し、該試料に対し、上記の抗体を用いて ELISA 法あるいはウエスタンブロット法を実施すればよい。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

【実施例1】 レタスビッグベインウイルスの外被タンパク質遺伝子のクローニング

1997年に香川県のビッグベイン症を示したレタス（品種；シスコ）圃場より汚染土を採集し、乾燥状態で室温で保存した。ウイルス純化にはレタスの品種シスコを用い、ウイルス接種は土壌接種によった。

ウイルス純化はKuwataら（S.Kuwata *et al.*, (1983), 日植病報, 49, 246-251）の方法を改変して行った。まず、最初の低速遠心をやめ、1% Triton-X 処置、1% Brij-35 処理後、Cs₂SO₄の密度勾配遠心をし、ウイルス画分を得た。本純化法で得られた純化ウイルスを SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動すると、48k Da の一本のバンドのみが検出された。また、電子顕微鏡観察では LBVV の粒子の集塊のみが観察され他の不純物が観察されなかったことより、かなり高純度の純化ウイルスが得られていると推定された。

ウイルス核酸の抽出は、純化ウイルスを Proteinase K-SDS 処理後、フェノール/クロロホルム、エタノール沈殿で行った。また、第一鎖 cDNA の作製には精製ウイルス核酸を Dimethyl sulfoxide 変性して用いた。LBVV 感染葉からの Poly (A)⁺ RNA の抽出は、LBVV 感染し明瞭なビッグベイン症状を示したレタス葉から Dynabeads[®] mRNA DIRECT[™] Kit (DYNAL[®]社)を用いて行った。第一鎖 cDNA の作製にはランダムプライマーあるいは Oligo-dT-*Bam* HI プライマーを用い、SUPERSCRIPT[™] II RNase H⁻ Reverse Transcriptase (GIBCO BRL 社)で逆転写反応を行った。

LBVV 外被タンパク質の内部アミノ酸配列の決定は以下のようにして行った。純化 LBVV を 12.5% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、ニトロセルロース膜に転写し、目的のバンドを切り出し、カルボキシメチル化後、リジルエンドペ

プチターゼ処理した。処理後、逆相 HPLC により 38 本のバンドパターンを得た。それらのバンドのうち数バンドについてアミノ酸の配列を決定した。

得られた数種のアミノ酸配列のうち、ESWDDESTIAMP および NLEVPGVVDYIDA を基に 5LB111 プライマー (GARWSITGGGAYGAYGARWSIAC/配列番号: 7) および 3LB171 プライマー (GCRTCDATRTARTCIACICCCIGG/配列番号: 8) を設計し、TaKaRa Taq (タカラ社) を用いて PCR を行ったところ、274bp の PCR 産物が得られた。得られた PCR 産物を pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega 社) を用いてクローニングし、塩基配列を決定した。

LBVV の全外被タンパク質遺伝子を決定するために、純化ウイルスからの RNA あるいは LBVV 感染葉からの Poly(A)+ RNA を用いて 3' RACE あるいは 5' RACE を試みた。3' RACE では、RNA は LBVV 感染葉からの Poly(A)+ RNA を、PCR は Oligo-dT-Bam HI プライマーおよび 5LB171 プライマー (AAYYTIGARGTICCCIGGIGTIGA/配列番号: 9) を用い、891bp の PCR 産物を得た。5' RACE では、RNA は純化ウイルスからの RNA あるいは LBVV 感染葉からの Poly(A)+ RNA を、プライマーには 3LB5R4 プライマー (GTTTTTGACCCTGATAG/配列番号: 10) と 3LB5R5 プライマー (GTGACTCTAGACACTTGTGTTGTTGTCGTG/配列番号: 11) を用い、5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends、Version 2.0 (GIBCOBRL 社) によって 760bp の PCR 産物を得た。得られた PCR 産物は pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega 社) を用いてクローニングし、少なくとも 6 クローン以上の塩基配列を決定した。また、互いに重なるようにデザインしたプライマーで 500~700bp の外被タンパク質近傍の遺伝子の PCR 産物をクローニングし、少なくとも 3 クローンの塩基配列を決定し、外被タンパク質遺伝子の塩基配列を確認した。

以上の方法により、1425bp の塩基配列を決定した。本遺伝子は 209 塩基より翻訳がスタートし、397 のアミノ酸をコードしていた (配列番号: 1 参照)。

【実施例 2】 形質転換レタスの作製

(1) レタス種子の殺菌および培養

レタス種子を 70% エタノールに数秒間浸漬後、殺菌液 (10% 次亜塩素酸ナトリウム、0.05% Tween-20) に入れ 15 分間処理した。次に、種子を殺菌水ですすぎ、ハイボネックス寒天培地 (1 リットルの蒸留水に対し、ハイボネックス粉末を 3.0g、ショ糖を 10.0g、寒天を 8.0 g 溶かし、1N NaOH で pH を 5.8 に調整) の入ったプラントボックスに植え、明所 25~28°C で約 2 週間、本葉が 5cm 程度になるまで生育させた。

(2) アグロバクテリウムの培養と接種

250 μ g/ml ストレプトマイシン、5 μ g/ml リファンピシン、50 μ g/ml カナマイシンを含む YEB 液体培地 (1 リットルの蒸留水に、Yeast extract を 1.0g、Beef extract を 5.0g、Peptone を 5.0g、ショ糖を 5.0g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を 0.5g 溶かし、1N NaOH で pH を 7.0 に調整) にアグロバクテリウムを接種し、28°C で一晩振とう培養した。アグロバクテリウム培養液をさらに新しい YEB 培地 (前述の抗生物質を含む) に植え継ぎ、さらに 28°C で一日振とう培養した。

本葉が 5cm 程度になったレタスの幼植物をプラスチックシャーレに取り出し、本葉を 5mm 程度に刻み、10 倍希釈のアグロバクテリウム培養液に 1 分間浸漬した。次に、切片を 3% ショ糖、0.5ppm ベンジルアデニン (BAP)、0.1ppm ナフタレン酢酸 (NAA)、0.8% 寒天を含む MS 培地 (pH5.8) に 15~20 個/プレートになるように並べ、25°C、2000 ルクス、2 日間共存培養した。共存培養後、3% ショ糖、0.5ppm BAP、0.1ppm NAA、250 μ g/ml カルベニシリン、0.8% 寒天を含む MS 培地 (pH5.8) で 7 日間除菌培養した。

(3) 形質転換体の選抜と培養

除菌培養後、3% ショ糖、0.5ppm BAP、0.1ppm NAA、250 μ g/ml カルベニシリン、50 μ g/ml カナマイシン、0.8% 寒天を含む MS 培地 (pH5.8) に移し、25°C、2000 ルクスで培養を行った。約 2 週間ごとに植え継ぎを行い、2~3 カ月でアグロバクテリウムを接種したものから再分化するものが現れた。

再分化した個体を 3% ショ糖、0.3ppm BAP、500 μ g/ml カルベニシリン、0.8% 寒天を含む MS 培地(pH5.8)に移し、約 2 週間ごとに植え継ぎを行った。再分化個体が 3cm 程度の大きさになったら、500 μ g/ml のカルベニシリンを含む 1/2 倍 MS 寒天培地に茎葉を挿して植え発根させた。

(4) レタスの順化と採種

再分化個体が発根してシュートが 1~2cm 伸びてきた状態で、ハイポネクスの 500 倍希釈水溶液を浸したバーミキュライトにシュートを切って挿し木し発根させた。プラントボックスのふたを徐々に開けて換気し順化させた。十分順化したところで、閉鎖系温室内（最高気温 30℃以下、自然日長）でポリポット（クレハ園芸培土）に定植して、そのまま抽苔・開花させて採種した。

[実施例 3] LBVV の RNA2 遺伝子のクローニング

1997 年に香川県のビッグベイン症を示したレタス（品種；シスコ）圃場より汚染土を採集し、乾燥状態で室温で保存した。ウイルス純化にはレタスの品種シスコを用い、ウイルス接種は土壌接種によった。

ウイルスの純化および RNA の精製は実施例 1 にしたがって行った。cDNA の合成および塩基配列の決定は、C.F.Fazeli & M.A.Rezaian (Journal of General Virology, 81, 605-615) の方法にしたがい、下流方向にプライマーを合成して配列を伸ばして行くゲノムウォーキングの方法でおこなった。まず、実施例 1 を基にウイルス特異的な 5 LB5R3 プライマー (AGCTCTGAACAACGACATG/配列番号：16) を作製し、精製 LBVVRNA を鋳型として SUPERSCRIPT™ II RNase H⁻ Reverse Transcriptase で 1stcDNA を合成した。次に、Universal primer-dN6 (5'-GCCGGAGCTCTGCAGAATTCNNNNN-3'/配列番号：14) を用いクレノーフラグメント（タカラ社）で 2ndcDNA を合成した。GLASSMAX DNA Isolation Spin Cartridge System (Gibco BRL 社) で余分なプライマーを除去後、ウイルス特異的なプライマーと Universal primer (5'-GCCGGAGCTCTGCAGAATTC-3'/配列番号：15) を用い

て PCR を行い、得られた PCR 産物を pGEM[®]-T Easy Vector Systems を用いてクローニングし、塩基配列を決定した。同様な方法を 4 回繰り返し、5177 塩基までを決定した。RNA2 の 3'末端は 5'RACE で行い（注；精製 LBVV の RNA には+鎖と-鎖の両鎖が含まれているので 5'RACE で 5'末端のみならず 3'末端も決めることができる）、LBVV がコードする 5 つのタンパク質遺伝子を含む 6078bp の塩基配列を決定した（配列番号：1）。なお、互いに重なるようにデザインしたプライマーで 500~700bp の RNA2 の PCR 産物をクローニングし、少なくとも 3 クローンの塩基配列を決定し、RNA2 の塩基配列を確認した。

以上の方法により、6078bp の塩基配列を決定した。本遺伝子は 5 つのタンパクをコードした。タンパク 1（外被タンパク質；実施例 1）は 209 塩基より翻訳がスタートして 397 のアミノ酸をコードし（配列番号：2）、タンパク 2 は 1492 塩基より翻訳がスタートして 333 のアミノ酸をコードし（配列番号：3）、タンパク 3 は 2616 塩基より翻訳がスタートして 290 のアミノ酸をコードし（配列番号：4）、タンパク 4 は 3842 塩基より翻訳がスタートして 164 のアミノ酸をコードし（配列番号：5）、タンパク 5 は 4529 塩基より翻訳がスタートして 368 のアミノ酸をコードしていた（配列番号：6）。アミノ酸配列の相同性を他のウイルスと比較したところ、タンパク 1（外被タンパク質）のみが *Rhabdoviridae* 科に属するウイルスのヌクレオカプシドタンパク（外被タンパク質）と相同性が認められた。

〔実施例 4〕 LBVV ポリメラーゼ遺伝子のクローニング

1997 年に香川県のビッグベイン症を示したレタス（品種；シスコ）圃場より汚染土を採集し、乾燥状態で室温で保存した。ウイルス純化にはレタスの品種シスコを用い、ウイルス接種は土壌接種によった。

ウイルス純化は、実施例 1 のウイルス純化の手順と同様にして行った。高純度のウイルス核酸の抽出は以下のようにして行った。純化ウイルスを Proteinase

K-SDS 処理後、フェノール/クロロホルム抽出しエタノール沈殿した。次に、DNase 処理し The RNaid® Kit (BIO 101 社) でウイルス核酸を更に精製後、1% アガロースゲル (SEA PLAQUE GTG; FMC 社) 電気泳動で 2 本ある LBVV 核酸のうち 7.3kb のバンドを分取し、cDNA 合成に用いた。cDNA の合成は P. Froussard (Nucleic Acids Research, 20, 2900) の方法にしたがって行った。即ち、Universal primer-dN6 (5'-GCCGGAGCTCTGCAGAATTCNNNNNN-3' / 配列番号: 14) を用い SUPER SCRIPT™ II RNase H⁻ Reverse Transcriptase で 1stcDNA を合成した。次に、クレノーフラグメントで 2ndcDNA を合成し、Universal primer (5'-GCCGGAGCTCTGCAGAATTC-3' / 配列番号: 15) を用いて PCR を行い、得られた PCR 産物を pGEM®-T Easy Vector Systems を用いてクローニングし、塩基配列を決定した。

500bp 前後の LBVV のポリメラーゼ遺伝子断片を 8 個得た。ポリメラーゼ遺伝子の両末端は 5' RACE で、その断片間は PCR で埋め、全ポリメラーゼ遺伝子を含む 6793bp の塩基配列を決定した (配列番号: 12)。なお、互いに重なるようにデザインしたプライマーで 500~700bp のポリメラーゼ遺伝子の PCR 産物をクローニングし、少なくとも 3 クローンの塩基配列を決定し、ポリメラーゼ遺伝子の塩基配列を確認した。

本遺伝子は 337 塩基より翻訳がスタートし、2040 のアミノ酸をコードしていた (配列番号: 13)。アミノ酸配列の相同性を他のウイルスと比較したところ、Mononegavirales 目に属するウイルスのポリメラーゼとの相同性が確認され、特に、Rhabdoviridae 科に属するウイルスのポリメラーゼと高い相同性があり、ポリメラーゼ活性を担うとされる 4 つのモチーフも保存されていた。

産業上の利用の可能性

本発明により、レタスビッグベインウイルスのタンパク質をコードする核酸が単離され、その一次構造が解明された。該核酸あるいはそのアンチセンス核酸をレタスで発現させることにより、該ウイルスに対する抵抗性を有するレタス植物

体の作出が可能となった。また、該核酸やそれにコードされるタンパク質を検出することにより、レタスビッグベインウイルスの感染を診断することが可能となった。

請求の範囲

1. レタスビッグベインウイルスのタンパク質をコードする下記 (a) または (b) の核酸。
(a) 配列番号：2 から 6、または 13 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする核酸。
(b) 配列番号：1 または 12 に記載の塩基配列のコード領域を含む、(a) に記載の核酸。
2. RNA である、請求項 1 に記載の核酸。
3. DNA である、請求項 1 に記載の核酸。
4. 請求項 2 に記載の核酸の相補鎖に相補的なセンス RNA をコードする DNA。
5. 請求項 2 に記載の核酸と相補的なアンチセンス RNA をコードする DNA。
6. 請求項 2 に記載の核酸を特異的に開裂するリボザイム活性を有する RNA をコードする DNA。
7. 請求項 3 に記載の核酸を含むベクター。
8. 請求項 3 に記載の核酸または請求項 7 に記載のベクターを保持する形質転換細胞。
9. 請求項 1 に記載の核酸によりコードされるタンパク質。
10. 請求項 9 に記載のタンパク質に結合する抗体。
11. 請求項 8 に記載の形質転換細胞を培養し、該形質転換細胞またはその培養上清から発現させたタンパク質を回収する工程を含む、請求項 9 に記載のタンパク質の製造方法。
12. 請求項 4 から 6 のいずれかに記載の DNA を含むベクター。
13. 請求項 1 に記載の核酸、請求項 4 から 6 のいずれかに記載の DNA、または請求項 7 もしくは 12 に記載のベクターを保持する形質転換レタス細胞。
14. 請求項 13 に記載の形質転換レタス細胞を含む形質転換レタス植物体。

15. 請求項14に記載の形質転換レタス植物体の子孫またはクローンである、形質転換レタス植物体。

16. 請求項14または15に記載の形質転換レタス植物体の繁殖材料。

17. レタスビックベインウイルスの感染を診断する方法であって、レタス細胞またはレタスビックベインウイルスの媒介菌である *Olpidum* における、請求項1に記載の核酸または請求項9に記載のタンパク質を検出することを特徴とする方法。

SEQUENCE LISTING

<110> NATIONAL AGRICULTURAL RESEARCH ORGANIZATION

<120> Nucleotide sequence coding for lettuce big-vein virus and it's application

<130> MOA-A0002Y1P

<140>

<141>

<150> JP 2000-154440

<151> 2000-05-22

<150> JP 2001-65339

<151> 2001-03-08

<160> 16

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 6078

<212> DNA

<213> Lettuce Big-vein Virus

<400> 1

tggaaaccca aaaatcataa aaaacttcta ctatittacc acccaacgat cttgaaagct 60
cctcgcgga aaataacata caactgtacg ttccaaccgt tccgctatit tccaggctgt 120
tcgcattttc ttttccccta cttcgacctt ttccctatct ccctattccc ctattttcaa 180
agactttcgg attccatcac cctataaaat ggcacacccc aaattgaaga tgctcgatgc 240
attcagtgc gtcgtggaaa tcacaggaaa gactgccggg aaagaatcct gggatgatga 300
aagcacaata gctatgccat cctataagct ttccgtactg tccgacgccg atgctgttcg 360
tgaggtgaag atcttctga cagggtatit tgtgaggtcc tctccgaggc cgattgctgc 420
agctctcatc atgacatgga acatgaggtc tgttgatccc gtggctgtca gaattattccc 480
cgcaaaggac aaggggaaag acacagcgga tgtggatgtc aagaatctgg aggtgcccgg 540
ggtcgactac atagacgcaa tggtagagac caatgtgaag gatgcttctg atatagaaat 600
tattagagcc ggagcattca tcgctgcctc cacgctcaag atgttcgcaa agtccttcac 660
tggatggact caggcttggg aacacaagca tatccaaaaa aggtatgctg atttctgtaa 720
gaccgagtat ccattcaagg aattcacgac aaacaacaag tgcgcagaga ccatgtacga 780
ggcctatcag ggtcaaaaac tgtatcaagg aactctagc agaatcctct atgctctggg 840
agatgtggca gatccaaggc agactgagat gttgtttgat caacatcttg ccaacactgg 900
catgcacatc atccccagt tcacaaatgc tcaactctcg atcggtgcca ccacggcggg 960
gttactaagt gccctcaact acggacagaa cttcggcact ctaatgcagc tcaaaaagct 1020
catcaacgag agtctcagca aaccaccggg tccagacaac agagcaacct ggagattcgc 1080
caggatcttt gatccatctg tctttcaaac cctccagaca aaatactgtg cagataccgt 1140
tgccatcttg gcaaacatca attccatggg aaagctatcc acagagacta gcaatcctct 1200
gaacattgct gtgctaaagc agatggcccc ggagaggaag aggtacacga gacaggtggc 1260
gaagaacatc taccatcact tcatggtggt tgccagagct ctgaacaacg acatgttcga 1320
cacagacaaa tacaagtttg tagagtccga cgatgaggag gaacatgtcg caaatgaggg 1380
agagacacca gtgaaggagt gatgagggat cctactatca tatgtaaaaa aacgagaaag 1440

acaactatag gtactaaact aagagagaaa ttgagacgat tatctttgac aatgacagga 1500
aggtttgtta gagatcagtc agctatgaca aaggccattg catcatctgg taaggcaggt 1560
caggaaacta ccaaacagac cacaagtgcg gaaaagttag agagtgaaaa tgcattacta 1620
tccactgtaa aggagatgaa ccagggatgg atgtctcgtc taggtgcagg caatgattat 1680
gatgagactg aggcagaccc cgctgataca tatggagata cagaagctga tctgcctcca 1740
actataaaac cggagcatat caagaaagaa actcgcaaac aagacaaggc tcttggaatc 1800
aagaatgtgg cggggacttc ggagtctgaa agaaaagctc ttaagcaatg ggatgaggat 1860
gaaaacaaga gtgatacaga gaagctggcc ttcttggcag gattcaggta cegtcaagat 1920
cacaactctg tagtactacg tgcacagacc gagcagttga agtccttgt ggatatcctg 1980
acctcgtctg caacctctgt gtcaagagcc gcttctgata ttgtaaatgc aaccacgatg 2040
tcgacttcca agttggctgc tgcaatcacc aaacacatcg aagttcctcc ccatgagaca 2100
ttgaccaaga tagagatgcc aaaacttcct cttatcagct cagaagctgg gtctatatct 2160
ggagtgaaga gtgttgatgg aaagtcggtc gatgaagaaa taattgacag caacaagaag 2220
gagagcacta ggatcaagga ggaggcaaag actccaaagc ctcaaatagt caccctcct 2280
gttatcgata gtggacctat cataacagtt ggacaaatgg caagtgttct tgggggggag 2340
gttaaggata tcttagagtt ctacgagatc ggaatggaga agtttgagtc tgtagctaag 2400
gacttgggac tctcttatga aggtcttctc aggaaatacg ggggcctctc tggattgaaa 2460
ggaacattga agaagaagat caacctgctg tgaaaatcct ctgaaaagga atcctaagat 2520
gaatgttcgt ttctgtacct ctgtaccatg ctgtcgtcaa taagtaaaaa aacgagaata 2580
taagtcaata tttgtcaaag tccaattctg atatcatgtc tttgaaatct gtccttacc 2640
tatctgaaat ctcggtctct aatggtgact ccgggattgg atttgatgga ggatgtgctg 2700
atccttatgc tccgtcccg gtgccctctc gtcgttggga ttactccacc aaatgggata 2760
tgaagataac cggggcagcg agagaattca acctgtccaa acagcctgtt ctcacggggc 2820
tcatcaacag catgaggatg aagacatctc tcactcatcc cgagattcac gtggtgtgga 2880
gagggttggg tctcctgct gtctgcagag acgatgtgg cgtgactctc aggttcaccc 2940
cggatagaag tgagaagatg ggtttgattg cccaacatac tcatggaatg catctctata 3000

tgcacatgt gttctatccc agccacagca taagggtggg tcctggagaa ccacttcct 3060
gggccgttgg attctctgtt cggacttct cgtagaccc caattacaca attgccgaag 3120
tgcagtctcg cctcacggg tatttctctg agcttcctga gtacgatatt cagcgagact 3180
ctgagttgat ctccattgtc cctatggaag agcatgtaac aggatatgcc acttctgccc 3240
ctaggatccc caacactgct tgggtggccc gaggatacaa gataggagt aatgggaaca 3300
gtctagcaaa gaagatcaaa ttctgcagg agatcggggt ggatatagag gctctcagaa 3360
tggtgggcca gctagataac accctgaaga aggtgagtcc acgtgctata gatggatcac 3420
catctgcaga ggcgaagagt gaagctgccc gccttgtaga tgctcatgtt aagacctca 3480
ctgcttgaca ggaggctcag agagacaata agagattga gatgaggatt gactccttag 3540
tcaataaatt ggatagctac acaagactgg ctggttggtt cttgttgctg ctctctggaa 3600
taataggagc tcttcattat ttcttcatt acgtgtcttc tctgtgatac tgattgtgtg 3660
atctttcctg ttacttgtct agatggtgtt agatgttaga gtctgtggtt tgtgatagaa 3720
gttatatttc caattctgta ttagattgtt tgttaaaaat tagaaggcca tcgtttgttt 3780
gtgtcatagt aatcggccta tatgtaaaaa aacgagagtg taagctaata ataactatta 3840
gatggacgag gaaaatgtcg acataactga ggatgaactt tctgtcattt ccgacctaga 3900
gttgattca attactcggg tggtaggcac aaacgaaatt aagacctacg aggactacaa 3960
gctggaggaa gccaaactatc ttaaggctct ggatgcattt aagaagttct ctacttcaga 4020
cacctgtgag tgttacagat gtgagctgtt cgagagagga gatatcgga aatttctgac 4080
gaggtctgag ttctccaaac tagcagtcct ctattgggag agatgtggac gccctagaaa 4140
ctcgggaagct ttggaggcat ttataggaag gcacatctgt ataagatgtg cagcctcaat 4200
ccttctgagc catcatcccc tgatcgccat gagggcggat atgagacttc gggagatata 4260
tatagagaac ggagataaac ctgcattctt ttcggggaca ttgttctccg ccaaggggaa 4320
gggacctaga atctaattgtc ctgaaccatt tttgcaattt aaaagtatta gaaaaaacgg 4380
ttctaaagca gtacatctca tatcattgca gaagaacgtg agagccatat tcgccttctc 4440
ataatatatc ttatgctctg caagtctacc gaatccgata tctgtaacgc accaggtatt 4500
caaacattca agctcttggt aattcaatat ggtgagaga tgcttcgaag ctgcatgac 4560

atacatgate ccaaacaage agagtgtgga ggtctttgaa ggtcttctag gaatattgga 4620
tctgtccta acttctaacc atgtgcggag ggtgtaccag gagataacag tctctttct 4680
catgatatct ctaatttcg atcaggttga ctccaagggg atcgtgagaa tgtcagatag 4740
tcagggggat gatgatgact cattgagctc attgacctgg aattctaaga ataaactctg 4800
gggatttcta gtaaaccgg tccctatcac ctcgagtgat ctggagaaac gactaagaat 4860
ctctgtatg atcagctcca atgcttacag aattgttaca aatgtggccc aggtcagatt 4920
tctgtcagg attgggacat ttctcttgt tctcagcaga gaactgggat tcttatgtcc 4980
ttctcttct cggtttccaa gtgtgatatt tgtatctct gacaagcaga cggagatgct 5040
caggataatc tcttcttatt actctgtcgg ggatactgag gagaaaaact gctgggggat 5100
attgggagag agatatctta caaccatata agaggatatt tctaactctgg ttgtcatggc 5160
ctttcccttc ttgcaggag ctttccactg ctctctgtc tattatctga attttgatg 5220
taagatggca gcagaggat ttcattgcat agcccgagaa gaactcagaa tcgctctgag 5280
caatccggtc ctgtggagcg attgtcctct gaaaagggtac tacgattccc tcttgagag 5340
aattccaaca ggcgttcata tcagtcactc ggaagaaaag ggtgatcca catttttgcc 5400
attagcagaa tattgtagca gtcatagga atgttgatc tgtggagatc ttaagctcgg 5460
tgtagatagg ggaatagggg cagatttcag acatctgtca gaaagaagga catcctctcc 5520
agatggtttg gatgctgtga tgagtgtgt ctctagaatg atatatcatc attggagcat 5580
cccatcctgg gtctctgggg catttaagat tgcaaagttc ataggagctc attaattca 5640
cattcatatg ctcttgaaca ctatatctcc catcttttgt ctacaattaa ataaggaga 5700
gctttcatct tattagaaaa aacgatgtcc cattttttgc tcagcccgat gggatatgaa 5760
gatctgtgta cataggtgga tctggaacaa gccgccatct ttttattcct aaggtatgag 5820
aaagggacgg atgaaagaga gcgtgagatc ttccaccaac ttaaggcact tatcggaggt 5880
aaaagtcata tgggtgcctg gaatgagaag tatggaaaaa atcgatcct gtgaacattg 5940
tgaaaaataa aaaaagaaga tttccgggaa tgttaaaacg ttggagtcta ccagcccgct 6000
aaagcaagtt gagttctaac aaagccgtgt tagtcggggt cttgattttg atgattttgt 6060
tgtgctgtgt ttgcgacg 6078

<210> 2

<211> 397

<212> PRT

<213> Lettuce Big-vein Virus

<400> 2

Met Ala His Pro Lys Leu Lys Met Leu Asp Ala Phe Ser Asp Val Val

1 5 10 15

Glu Ile Thr Gly Lys Thr Ala Gly Lys Glu Ser Trp Asp Asp Glu Ser

20 25 30

Thr Ile Ala Met Pro Ser Tyr Lys Leu Ser Val Leu Ser Asp Ala Asp

35 40 45

Ala Val Arg Glu Val Lys Ile Phe Leu Thr Gly Leu Phe Val Arg Ser

50 55 60

Ser Pro Arg Ala Ile Ala Ala Ala Leu Ile Met Thr Trp Asn Met Arg

65 70 75 80

Ser Val Asp Pro Val Ala Val Arg Ile Phe Pro Ala Lys Asp Lys Gly

85 90 95

Lys Asp Thr Ala Asp Val Asp Val Lys Asn Leu Glu Val Pro Gly Val

100

105

110

Asp Tyr Ile Asp Ala Met Val Glu Thr Asn Val Lys Asp Ala Ser Asp

115

120

125

Ile Glu Ile Ile Arg Ala Gly Ala Phe Ile Ala Ala Ser Thr Leu Lys

130

135

140

Met Phe Ala Lys Ser Phe Thr Gly Trp Thr Gln Ala Trp Glu His Lys

145

150

155

160

His Ile Gln Lys Arg Tyr Ala Asp Phe Cys Lys Thr Glu Tyr Pro Phe

165

170

175

Lys Glu Phe Thr Thr Asn Asn Lys Cys Ala Glu Thr Met Tyr Glu Ala

180

185

190

Tyr Gln Gly Gln Lys Leu Tyr Gln Gly Thr Leu Gly Arg Ile Leu Tyr

195

200

205

Ala Leu Gly Asp Val Ala Asp Pro Arg Gln Thr Glu Met Leu Phe Asp

210

215

220

Gln His Leu Ala Asn Thr Gly Met His Ile Ile Pro Gln Phe Thr Asn

225

230

235

240

Ala Gln Leu Ser Ile Gly Ala Thr Thr Ala Gly Leu Leu Ser Ala Leu

245

250

255

Asn Tyr Gly Gln Asn Phe Gly Thr Leu Met Gln Leu Lys Lys Leu Ile

260

265

270

Asn Glu Ser Leu Ser Lys Pro Pro Gly Pro Asp Asn Arg Ala Thr Trp

275

280

285

Arg Phe Ala Arg Ile Phe Asp Pro Ser Val Phe Gln Thr Leu Gln Thr

290

295

300

Lys Tyr Cys Ala Asp Thr Val Ala Ile Leu Ala Asn Ile Asn Ser Met

305

310

315

320

Gly Lys Leu Ser Thr Glu Thr Ser Asn Pro Leu Asn Ile Ala Val Leu

325

330

335

Lys Gln Met Ala Pro Glu Arg Lys Arg Tyr Thr Arg Gln Val Ala Lys

340

345

350

Asn Ile Tyr His His Phe Met Val Val Ala Arg Ala Leu Asn Asn Asp

355

360

365

Met Phe Asp Thr Asp Lys Tyr Lys Phe Val Glu Ser Asp Asp Glu Glu

370

375

380

Glu His Val Ala Asn Glu Gly Glu Thr Pro Val Lys Glu

385

390

395

<210> 3

<211> 333

<212> PRT

<213> Lettuce Big-vein Virus

<400> 3

Met Thr Gly Arg Phe Val Arg Asp Gln Ser Ala Met Thr Lys Ala Ile

1

5

10

15

Ala Ser Ser Gly Lys Ala Gly Gln Glu Thr Thr Lys Gln Thr Thr Ser

20

25

30

Ala Glu Lys Leu Glu Ser Glu Asn Ala Leu Leu Ser Thr Val Lys Glu

35

40

45

Met Asn Gln Gly Trp Met Ser Arg Leu Gly Ala Gly Asn Asp Tyr Asp

50

55

60

Glu Thr Glu Ala Asp Pro Ala Asp Thr Tyr Gly Asp Thr Glu Ala Asp

65

70

75

80

Leu Pro Pro Thr Ile Lys Pro Glu His Ile Lys Lys Glu Thr Arg Lys
85 90 95

Gln Asp Lys Ala Leu Gly Ile Lys Asn Val Ala Gly Thr Ser Glu Ser
100 105 110

Glu Arg Lys Ala Leu Lys Gln Trp Asp Glu Asp Glu Asn Lys Ser Asp
115 120 125

Thr Glu Lys Leu Ala Phe Leu Ala Gly Phe Arg Tyr Arg Gln Asp His
130 135 140

Asn Ser Val Val Leu Arg Ala Gln Thr Glu Gln Leu Lys Ser Leu Val
145 150 155 160

Asp Ile Leu Thr Ser Ser Ala Thr Ser Val Ser Arg Ala Ala Ser Asp
165 170 175

Ile Val Asn Ala Thr Thr Met Ser Thr Ser Lys Leu Ala Ala Ala Ile
180 185 190

Thr Lys His Ile Glu Val Pro Pro His Glu Thr Leu Thr Lys Ile Glu
195 200 205

Met Pro Lys Leu Pro Leu Ile Ser Ser Glu Ala Gly Ser Ile Ser Gly

210 215 220
Val Lys Ser Val Asp Gly Lys Ser Val Asp Glu Glu Ile Ile Asp Ser
225 230 235 240
Asn Lys Lys Glu Ser Thr Arg Ile Lys Glu Glu Ala Lys Thr Pro Lys
245 250 255
Pro Gln Ile Val Thr Pro Pro Val Ile Asp Ser Gly Pro Ile Ile Thr
260 265 270
Val Gly Gln Met Ala Ser Val Leu Gly Gly Glu Val Lys Asp Ile Leu
275 280 285
Glu Phe Tyr Glu Ile Gly Met Glu Lys Phe Glu Ser Val Ala Lys Asp
290 295 300
Leu Gly Leu Ser Tyr Glu Gly Leu Leu Arg Lys Tyr Gly Gly Leu Ser
305 310 315 320
Gly Leu Lys Gly Thr Leu Lys Lys Lys Ile Asn Leu Leu
325 330

<210> 4

<211> 290

<212> PRT

<213> Lettuce Big-vein Virus

<400> 4

Met Ser Leu Lys Ser Ala Pro Tyr Leu Ser Glu Ile Ser Val Ser Asn

1 5 10 15

Gly Asp Ser Gly Ile Gly Phe Asp Gly Gly Cys Ala Asp Pro Tyr Ala

20 25 30

Pro Ser Arg Val Pro Ser Arg Arg Trp Asp Tyr Ser Thr Lys Trp Asp

35 40 45

Met Lys Ile Thr Gly Ala Ala Arg Glu Phe Asn Leu Ser Lys Gln Pro

50 55 60

Val Leu Thr Gly Leu Ile Asn Ser Met Arg Met Lys Thr Ser Leu Thr

65 70 75 80

His Pro Glu Ile His Val Val Trp Arg Gly Leu Val Pro Pro Ala Val

85 90 95

Cys Arg Asp Asp Val Val Val Thr Leu Arg Phe Thr Pro Asp Arg Ser

100 105 110

Glu Lys Met Gly Leu Ile Ala Gln His Thr His Gly Met His Leu Tyr

115	120	125
Met His His Val Phe Tyr Pro Ser His Ser Ile Arg Val Gly Pro Gly		
130	135	140
Glu Pro Leu Pro Trp Ala Val Gly Phe Ser Val Pro Asp Phe Ser Leu		
145	150	155
		160
Asp Pro Asn Tyr Thr Ile Ala Glu Val His Val Arg Leu Thr Gly Tyr		
	165	170
		175
Phe Ser Glu Leu Pro Glu Tyr Asp Ile Gln Arg Asp Ser Glu Leu Ile		
180	185	190
Ser Ile Val Pro Met Glu Glu His Val Thr Gly Tyr Ala Thr Ser Ala		
195	200	205
Pro Arg Ile Pro Asn Thr Ala Trp Val Ala Arg Gly Tyr Lys Ile Gly		
210	215	220
Val Asn Gly Asn Ser Leu Ala Lys Lys Ile Lys Phe Leu Gln Glu Ile		
225	230	235
		240
Gly Val Asp Ile Glu Ala Leu Arg Met Val Gly Gln Leu Asp Asn Thr		
	245	250
		255

Leu Lys Lys Val Ser Pro Arg Ala Ile Asp Gly Ser Pro Ser Ala Glu

260

265

270

Ala Lys Ser Glu Ala Ala Arg Leu Val Asn Ala His Val Lys Thr Leu

275

280

285

Thr Ala

290

<210> 5

<211> 164

<212> PRT

<213> Lettuce Big-vein Virus

<400> 5

Met Asp Glu Glu Asn Val Asp Ile Thr Glu Asp Glu Leu Ser Val Ile

1

5

10

15

Ser Asp Leu Glu Leu Asp Ser Ile Thr Arg Val Val Gly Thr Asn Glu

20

25

30

Ile Lys Thr Tyr Glu Asp Tyr Lys Leu Glu Glu Ala Asn Tyr Leu Lys

35

40

45

Val Leu Asp Ile Ile Lys Lys Phe Ser Thr Ser Asp Thr Cys Glu Cys

50

55

60

Tyr Arg Cys Glu Leu Phe Glu Arg Gly Asp Ile Gly Lys Phe Leu Thr

65

70

75

80

Arg Ser Glu Phe Ser Lys Leu Ala Val Leu Tyr Trp Glu Arg Cys Gly

85

90

95

Arg Pro Arg Asn Ser Glu Ala Leu Glu Ala Phe Ile Gly Arg His Ile

100

105

110

Cys Ile Arg Cys Ala Ala Ser Ile Leu Leu Ser His His Pro Val Ile

115

120

125

Ala Met Arg Ala Asp Met Arg Leu Arg Glu Ile Tyr Ile Glu Asn Gly

130

135

140

Asp Lys Pro Ala Ser Ser Ser Gly Thr Leu Phe Ser Ala Lys Gly Lys

145

150

155

160

Gly Pro Arg Ile

<210> 6

<211> 368

<212> PRT

<213> Lettuce Big-vein Virus

<400> 6

Met Ala Glu Arg Cys Phe Glu Ala Ala Met Thr Tyr Met Ile Pro Asn

1 5 10 15

Lys Gln Ser Val Glu Val Phe Glu Gly Leu Leu Gly Ile Leu Asp Pro

20 25 30

Val Leu Thr Ser Lys His Val Arg Arg Val Tyr Gln Glu Ile Thr Val

35 40 45

Ser Phe Leu Met Ile Ser Leu Ile Ser Asp Gln Val Asp Ser Lys Gly

50 55 60

Ile Val Arg Met Ser Asp Ser Gln Gly Asp Asp Asp Asp Ser Leu Ser

65 70 75 80

Ser Leu Thr Trp Asn Ser Lys Asn Lys Leu Trp Gly Phe Leu Val Asn

85 90 95

Pro Val Pro Ile Thr Ser Ser Asp Leu Glu Lys Arg Leu Arg Ile Ser

100 105 110

Cys Met Ile Ser Ser Asn Ala Tyr Arg Ile Gly Thr Asn Val Ala Gln

115 120 125
Val Arg Phe Leu Leu Arg Ile Gly Thr Phe Pro Leu Val Leu Ser Arg
130 135 140
Glu Leu Gly Phe Leu Cys Pro Ser Ser Ser Arg Phe Pro Ser Val Ile
145 150 155 160
Phe Val Ser Pro Asp Lys Gln Thr Glu Met Leu Arg Ile Ile Ser Ser
165 170 175
Tyr Tyr Ser Val Gly Asp Thr Glu Glu Lys Asn Cys Trp Gly Ile Leu
180 185 190
Gly Glu Arg Tyr Leu Thr Thr Ile Ser Glu Asp Ile Ser Asn Leu Val
195 200 205
Val Met Ala Phe Pro Phe Leu Gln Gly Ala Phe His Cys Ser Ser Val
210 215 220
Tyr Tyr Leu Asn Phe Gly Cys Lys Met Ala Ala Glu Gly Phe His Ala
225 230 235 240
Ile Ala Arg Glu Glu Leu Arg Ile Ala Leu Ser Asn Pro Val Leu Trp
245 250 255

Ser Asp Cys Pro Leu Lys Arg Val Tyr Asp Ser Leu Leu Gln Arg Ile

260

265

270

Pro Thr Gly Val His Ile Ser His Ser Glu Glu Lys Gly Asp Pro Thr

275

280

285

Phe Leu Pro Leu Ala Glu Tyr Cys Ser Ser His Arg Glu Cys Trp Ile

290

295

300

Cys Gly Asp Leu Lys Leu Gly Val Asp Arg Gly Ile Gly Ala Asp Phe

305

310

315

320

Arg His Leu Ser Glu Arg Arg Thr Ser Ser Pro Asp Gly Leu Asp Ala

325

330

335

Val Met Ser Ala Val Ser Arg Met Ile Tyr His His Trp Ser Ile Pro

340

345

350

Ser Trp Val Ser Gly Ala Phe Lys Ile Ala Lys Phe Ile Gly Ala His

355

360

365

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<220>

<221> modified_base

<222> (6)

<223> i

<220>

<221> modified_base

<222> (21)

<223> i

<400> 7

garwsntggg aygaygarws nac

23

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<220>

<221> modified_base

<222> (15)

<223> i

<220>

<221> modified_base

<222> (18)

<223> i

<220>

<221> modified_base

<222> (21)

<223> i

<400> 8

gcrtcdatrt artcnacncc ngg

23

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<220>

<221> modified_base

<222> (6)

<223> i

<220>

<221> modified_base

<222> (12)

<223> i

<220>

<221> modified_base

<222> (15)

<223> i

<220>

<221> modified_base

<222> (18)

<223> i

<220>

<221> modified_base

<222> (21)

<223> i

<400> 9

aayytngarg tncngngt nga

23

<210> 10

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 10

gtttttgacc ctgatag

17

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially

synthesized primer sequence

<400> 11

gtcgactcta gacacttggt gttgtcgtg

30

<210> 12

<211> 6793

<212> DNA

<213> Lettuce Big-vein Virus

<220>

<221> CDS

<222> (337)..(6459)

<400> 12

cgagacgcat attcatacta aaattccaac aaatcaaaac cttttaacgc cggataaaca 60

gcctttcgtc gaggcattca gcgaccctat cgtttctggt ttgatgaatg ttgtgtattt 120

tatgttttcc gtgtttccat catecgattt ttccagatt tccctatctc caggttcttg 180

agacccttat ttctcttctt tcttctatta ctccctatcc ccgtaaccct taggattctg 240

aaccgttcag actctgagag taggatatac gtaaaaaaac gagaacaaaa ttcgctttta 300

aacattataa tatttagtaa gaactaagac aacgaa atg tct cta gca agc aga 354

Met Ser Leu Ala Ser Arg

1 5

atg aca agt gtt gga ggg gct gac aat tac gga gaa tcg gat tac gga 402

Met Thr Ser Val Gly Gly Ala Asp Asn Tyr Gly Glu Ser Asp Tyr Gly

10 15 20

tgg gat gag act gtt tta ggg gat atg cat ctt aac agc gcg atc aac 450

Trp Asp Glu Thr Val Leu Gly Asp Met His Leu Asn Ser Ala Ile Asn

25 30 35

ttg gat cta ttc aag gag ttc cta cac ata gat ccc ccc gtt tac aag 498

Leu Asp Leu Phe Lys Glu Phe Leu His Ile Asp Pro Pro Val Tyr Lys

40 45 50

gtc aag gaa aat cac agg tta aca gaa gag cta aga gaa ctt caa tcc 546

Val Lys Glu Asn His Arg Leu Thr Glu Glu Leu Arg Glu Leu Gln Ser

55 60 65 70

ctg gcc aga aag ggc tca aag ata gag atc ggg ttt cag aga ctg ttt 594

Leu Ala Arg Lys Gly Ser Lys Ile Glu Ile Gly Phe Gln Arg Leu Phe

75 80 85

gct cgc atg ttc ccc aga gac gga aat ctc ata ccc atg gat agc acg 642

Ala Arg Met Phe Pro Arg Asp Gly Asn Leu Ile Pro Met Asp Ser Thr

90	95	100	
atg acc aga atg ata atg aag ata atc aga gac tcg ggt acc aaa tac			690
Met Thr Arg Met Ile Met Lys Ile Ile Arg Asp Ser Gly Thr Lys Tyr			
105	110	115	
aag ctg gga atc cca ctg ctt gga atc tcg gag gaa atg atc aag aaa			738
Lys Leu Gly Ile Pro Leu Leu Gly Ile Ser Glu Glu Met Ile Lys Lys			
120	125	130	
ggg gcc atg gtt ccc agc aac ctc gta tat agc ttc aac tgc ttt ctc			786
Gly Ala Met Val Pro Ser Asn Leu Val Tyr Ser Phe Asn Cys Phe Leu			
135	140	145	150
aac atc ata tac ggg aga tca gaa tgg ata agg tca gaa ggt att gcc			834
Asn Ile Ile Tyr Gly Arg Ser Glu Trp Ile Arg Ser Glu Gly Ile Ala			
155	160	165	
att cgt ttc aaa atg tat gaa cat gga cga ttc atc agg aga gac ttg			882
Ile Arg Phe Lys Met Tyr Glu His Gly Arg Phe Ile Arg Arg Asp Leu			
170	175	180	
acg atc agc gag aaa gag tac aac ttc atc gtc ggg aag gag gtg gtc			930
Thr Ile Ser Glu Lys Glu Tyr Asn Phe Ile Val Gly Lys Glu Val Val			
185	190	195	

gag ata aga gca tcg agg aga aag gag aga ttc ata gca gat tac aac 978

Glu Ile Arg Ala Ser Arg Arg Lys Glu Arg Phe Ile Ala Asp Tyr Asn

200

205

210

tct ctc tta ctg ctg ttg gat gtt gca gga caa cga ata tgt gca cat 1026

Ser Leu Leu Leu Leu Leu Asp Val Ala Gly Gln Arg Ile Cys Ala His

215

220

225

230

cta tgt tct cag ctc ggg gaa ata tcc ggt gtt cca ggt tca ctc tct 1074

Leu Cys Ser Gln Leu Gly Glu Ile Ser Gly Val Pro Gly Ser Leu Ser

235

240

245

cga tac cat ctg gag act cta tgt act gcc ggg gat aga atg ata gaa 1122

Arg Tyr His Leu Glu Thr Leu Cys Thr Ala Gly Asp Arg Met Ile Glu

250

255

260

aga tgc ggt aac aag gca tac gag gtt cta gga atg tat gag gct ctc 1170

Arg Cys Gly Asn Lys Ala Tyr Glu Val Leu Gly Met Tyr Glu Ala Leu

265

270

275

tgc gtg gga agg ctc ttg gaa aac aac cca gac gga ata aca gac cat 1218

Cys Val Gly Arg Leu Leu Glu Asn Asn Pro Asp Gly Ile Thr Asp His

280

285

290

aca cag ttc tct gcg aac tgt gaa gag gaa cta cag gag cta att gcc 1266

Thr Gln Phe Ser Ala Asn Cys Glu Glu Glu Leu Gln Glu Leu Ile Ala

295 300 305 310
ggg tct gtc gaa cca gca ttc atg aag agt cag gtg gat ttg atc aaa 1314
Gly Ser Val Glu Pro Ala Phe Met Lys Ser Gln Val Asp Leu Ile Lys
315 320 325
act aca ctg gag aag atg aaa aat cag gat ata tcg aac gct ttc tgt 1362
Thr Thr Leu Glu Lys Met Lys Asn Gln Asp Ile Ser Asn Ala Phe Cys
330 335 340
cta tac aga gtc tgg gga cat cca aca gtg gac ata tat gag ggg atg 1410
Leu Tyr Arg Val Trp Gly His Pro Thr Val Asp Ile Tyr Glu Gly Met
345 350 355
aaa aaa gtg cat act ata ggg aca aaa gtg aag gtg att cct ccg aat 1458
Lys Lys Val His Thr Ile Gly Thr Lys Val Lys Val Ile Pro Pro Asn
360 365 370
cta gga aca atc atg gta tgc caa ttc agg aag atg ttc atg tca acc 1506
Leu Gly Thr Ile Met Val Cys Gln Phe Arg Lys Met Phe Met Ser Thr
375 380 385 390
ttc ttc aag aag cat cat agg tac cca ccc atc acg gga acc cca gga 1554
Phe Phe Lys Lys His His Arg Tyr Pro Pro Ile Thr Gly Thr Pro Gly
395 400 405

gaa tat cta gag aga tgt cta aag gac aat gtc gcg atc agg ata gag 1602

Glu Tyr Leu Glu Arg Cys Leu Lys Asp Asn Val Ala Ile Arg Ile Glu

410

415

420

cac ctt gca tac aat cta aga gac ttc gag ttc atc aga ata ggg gag 1650

His Leu Ala Tyr Asn Leu Arg Asp Phe Glu Phe Ile Arg Ile Gly Glu

425

430

435

aca tac agt gtt cca gac aca ttc gat atg tgt cat gtg ctc aat gac 1698

Thr Tyr Ser Val Pro Asp Thr Phe Asp Met Cys His Val Leu Asn Asp

440

445

450

aaa gca gtc agt ccc gac atg tca gag ctc tta gag tca ata aag aac 1746

Lys Ala Val Ser Pro Asp Met Ser Glu Leu Leu Glu Ser Ile Lys Asn

455

460

465

470

ggg aaa gga act agt tgt gga gca aaa aga agg gga ata ttg aga tgg 1794

Gly Lys Gly Thr Ser Cys Gly Ala Lys Arg Arg Gly Ile Leu Arg Trp

475

480

485

atg gag gga gac agt ctg aac tgt aaa tca ttt ctc tca gac att gat 1842

Met Glu Gly Asp Ser Leu Asn Cys Lys Ser Phe Leu Ser Asp Ile Asp

490

495

500

gaa aag gga ctg agc gag gag gat ctt ctg ata gga atg tat gag aag 1890

Glu Lys Gly Leu Ser Glu Glu Asp Leu Leu Ile Gly Met Tyr Glu Lys

505 510 515

gag cga gag atc aag gtt gct gct aga atg tac tct ctg atg aca gag 1938
Glu Arg Glu Ile Lys Val Ala Ala Arg Met Tyr Ser Leu Met Thr Glu

520 525 530

agg atg aga tac tat ttt gtc ttg act gaa ggg ctc att gca gac tac 1986
Arg Met Arg Tyr Tyr Phe Val Leu Thr Glu Gly Leu Ile Ala Asp Tyr

535 540 545 550

ata ctg ccc cat ttc cct gag atc aca atg aag gac agc ctg aac gta 2034
Ile Leu Pro His Phe Pro Glu Ile Thr Met Lys Asp Ser Leu Asn Val

555 560 565

tta ctg aag aag atg tgg gag tct gga gga cag aga agt ata gga tca 2082
Leu Leu Lys Lys Met Trp Glu Ser Gly Gly Gln Arg Ser Ile Gly Ser

570 575 580

atg gat gtg aac ata aac atc gac ttc tcc aag tgg aat aca aac atg 2130
Met Asp Val Asn Ile Asn Ile Asp Phe Ser Lys Trp Asn Thr Asn Met

585 590 595

aga gaa ggg ccc acc agt gac aca ttc aga gag atg gac gga ata ttt 2178
Arg Glu Gly Pro Thr Ser Asp Thr Phe Arg Glu Met Asp Gly Ile Phe

600 605 610

ggg ttc aaa agg ttg ata gcc aga aca cat gag atc ttc aat gca tct 2226
Gly Phe Lys Arg Leu Ile Ala Arg Thr His Glu Ile Phe Asn Ala Ser
615 620 625 630

ctg gtc tat tca gca tca ggg aag tac ctt cct acc atc gag gac ggt 2274
Leu Val Tyr Ser Ala Ser Gly Lys Tyr Leu Pro Thr Ile Glu Asp Gly
635 640 645

aga atc cta gat gat cct ccc atg tgt tac aga ggg cac cta gga ggg 2322
Arg Ile Leu Asp Asp Pro Pro Met Cys Tyr Arg Gly His Leu Gly Gly
650 655 660

ttc gag ggg ctg agg cag aag gga tgg aca gta gca act gta tgc ttg 2370
Phe Glu Gly Leu Arg Gln Lys Gly Trp Thr Val Ala Thr Val Cys Leu
665 670 675

ctc gca tat ctc tca gag cag aac aag atc cag atg aag ttg atg gga 2418
Leu Ala Tyr Leu Ser Glu Gln Asn Lys Ile Gln Met Lys Leu Met Gly
680 685 690

cag ggt gac aat cag atc atc agg cta agg atg ccg acc agc tac tgg 2466
Gln Gly Asp Asn Gln Ile Ile Arg Leu Arg Met Pro Thr Ser Tyr Trp
695 700 705 710

gat agc tta cga ctc aca gag gag atg aag aag aag gag gcc agg att 2514
Asp Ser Leu Arg Leu Thr Glu Glu Met Lys Lys Lys Glu Ala Arg Ile

715 720 725
cta tct gac aag ttc gtg cat gag atg gac ata ata ttc aca gga gta 2562
Leu Ser Asp Lys Phe Val His Glu Met Asp Ile Ile Phe Thr Gly Val
730 735 740
gga ctt ccg atc aag gtc aga gag aca tgg aaa tcg aca cga ctt ttc 2610
Gly Leu Pro Ile Lys Val Arg Glu Thr Trp Lys Ser Thr Arg Leu Phe
745 750 755
atg tac gga aag gta atg cta tta gac gga cgg cag ctc cct caa tgg 2658
Met Tyr Gly Lys Val Met Leu Leu Asp Gly Arg Gln Leu Pro Gln Trp
760 765 770
tat aag aaa act ctc aga tca tat gct cta agc aat gag gga acc ctg 2706
Tyr Lys Lys Thr Leu Arg Ser Tyr Ala Leu Ser Asn Glu Gly Thr Leu
775 780 785 790
aca atc agt ggg gtg atc gga acc atc gct acc aac atg tgt gcg gca 2754
Thr Ile Ser Gly Val Ile Gly Thr Ile Ala Thr Asn Met Cys Ala Ala
795 800 805
gga gga gga agt gaa gtg ccc tgt gtt atg tat ctc ttc ttc ttg ttg 2802
Gly Gly Gly Ser Glu Val Pro Cys Val Met Tyr Leu Phe Phe Leu Leu
810 815 820

ttg gcg gag tgg tca ctc gag ttc atg ttc agg tat cat ccg ttc aca 2850

Leu Ala Glu Trp Ser Leu Glu Phe Met Phe Arg Tyr His Pro Phe Thr

825

830

835

agg gtt ggg atc aag gat ggg agt tca atg gag ttt cga ctg aac gag 2898

Arg Val Gly Ile Lys Asp Gly Ser Ser Met Glu Phe Arg Leu Asn Glu

840

845

850

aag gga gga tat gtt cat aag cag act cga aag aca aac aat ctg tgg 2946

Lys Gly Gly Tyr Val His Lys Gln Thr Arg Lys Thr Asn Asn Leu Trp

855

860

865

870

ctg aag tcc ctc ttg gtc cta gtg cct act gcc gtg gga gga agt gtt 2994

Leu Lys Ser Leu Leu Val Leu Val Pro Thr Ala Val Gly Gly Ser Val

875

880

885

act att cct ctc acc gga ttc ata atg aga gga ttt cct gac aaa gct 3042

Thr Ile Pro Leu Thr Gly Phe Ile Met Arg Gly Phe Pro Asp Lys Ala

890

895

900

tca gag ggt tat gcg tgg ctg aaa ttc tta ggg tca tca aag tct cct 3090

Ser Glu Gly Tyr Ala Trp Leu Lys Phe Leu Gly Ser Ser Lys Ser Pro

905

910

915

atc cag ggc ttc ctg aag aac ttc tat acc ttc ctt ccc aac gat acc 3138

Ile Gln Gly Phe Leu Lys Asn Phe Tyr Thr Phe Leu Pro Asn Asp Thr

920	925	930	
gta gaa gcc gac atg tta gtg cag tcc cct ttc tct ctg aac cat aag 3186			
Val Glu Ala Asp Met Leu Val Gln Ser Pro Phe Ser Leu Asn His Lys			
935	940	945	950
aga cct cca aca ccc ggg tta caa acg aaa gag aac ata aga gaa tgg 3234			
Arg Pro Pro Thr Pro Gly Leu Gln Thr Lys Glu Asn Ile Arg Glu Trp			
	955	960	965
ctg ctt tca aca ccg aga ttc caa cag aac cga ttc att cga agc atg 3282			
Leu Leu Ser Thr Pro Arg Phe Gln Gln Asn Arg Phe Ile Arg Ser Met			
	970	975	980
cag gtt ctc cta tca ggg ttt gac aag aaa agt gtt tgc cgt gaa ctc 3330			
Gln Val Leu Leu Ser Gly Phe Asp Lys Lys Ser Val Cys Arg Glu Leu			
	985	990	995
cta acg gag aga atg aat ccg ctg atc agt cac gaa gtc tat gag acc 3378			
Leu Thr Glu Arg Met Asn Pro Leu Ile Ser His Glu Val Tyr Glu Thr			
1000	1005	1010	
ttt ggg cat gtt tac tgt gag ggg atc gta gcc agg gta gag aac act 3426			
Phe Gly His Val Tyr Cys Glu Gly Ile Val Ala Arg Val Glu Asn Thr			
1015	1020	1025	1030

cga acg ata cga aca ctt cat ctc agc aga gag gac aga aag cca atc 3474

Arg Thr Ile Arg Thr Leu His Leu Ser Arg Glu Asp Arg Lys Pro Ile

1035

1040

1045

gtg gca aag cta atg act gat gag atg gca tac ata gca tat atg tgg 3522

Val Ala Lys Leu Met Thr Asp Glu Met Ala Tyr Ile Ala Tyr Met Trp

1050

1055

1060

tgg agg ggg aat act aag ggt gaa gtt ttt gag gaa tgt gca aca aag 3570

Trp Arg Gly Asn Thr Lys Gly Glu Val Phe Glu Glu Cys Ala Thr Lys

1065

1070

1075

cag gct cgg aaa ggt aga aat gtt ggc tgg aaa aga gag atc atg gga 3618

Gln Ala Arg Lys Gly Arg Asn Val Gly Trp Lys Arg Glu Ile Met Gly

1080

1085

1090

att acc aca cct cat cct ctg gaa gtg cta ttc caa agt gta tgc aga 3666

Ile Thr Thr Pro His Pro Leu Glu Val Leu Phe Gln Ser Val Cys Arg

1095

1100

1105

1110

cct ggg gac caa tgc caa aga tca gat gac tac atc aca tcg aag ctt 3714

Pro Gly Asp Gln Cys Gln Arg Ser Asp Asp Tyr Ile Thr Ser Lys Leu

1115

1120

1125

gta gac gac ggg aag ttt ccc cca ttc ctt ggg agc aag atc aag aac 3762

Val Asp Asp Gly Lys Phe Pro Pro Phe Leu Gly Ser Lys Ile Lys Asn

1130	1135	1140	
aag gtg tac tcg ctg cag gac gaa gaa gcg aga aga gaa cca ctg atc 3810			
Lys Val Tyr Ser Leu Gln Asp Glu Glu Ala Arg Arg Glu Pro Leu Ile			
1145	1150	1155	
aaa acc ggg gct aga ttg gcc aga cag ttc aat tgg atc gga atg gga 3858			
Lys Thr Gly Ala Arg Leu Ala Arg Gln Phe Asn Trp Ile Gly Met Gly			
1160	1165	1170	
gag aat atg aga gga ttg gtc tta aag aat gta ggg tcc ata tgc gat 3906			
Glu Asn Met Arg Gly Leu Val Leu Lys Asn Val Gly Ser Ile Cys Asp			
1175	1180	1185	1190
gtg tca gta ttt gac aag ttc gtt gat gat gat ccc tca gac aac cta 3954			
Val Ser Val Phe Asp Lys Phe Val Asp Asp Asp Pro Ser Asp Asn Leu			
1195	1200	1205	
tac act ggg tct ctc atg cac agg ttt acc ccc tcc tct gtc tct gaa 4002			
Tyr Thr Gly Ser Leu Met His Arg Phe Thr Pro Ser Ser Val Ser Glu			
1210	1215	1220	
ggc tgc ttc atc aac tat gca cct caa gtc ggt cac aag gtc ttc atg 4050			
Gly Cys Phe Ile Asn Tyr Ala Pro Gln Val Gly His Lys Val Phe Met			
1225	1230	1235	

tct tca gat aca ctc ccc tct ctc tcc aga ggc cag aca aac tac aca 4098

Ser Ser Asp Thr Leu Pro Ser Leu Ser Arg Gly Gln Thr Asn Tyr Thr

1240

1245

1250

ttt cat ttc caa gca atg tac tgc ttt ctt caa tac agc ata tcc aaa 4146

Phe His Phe Gln Ala Met Tyr Cys Phe Leu Gln Tyr Ser Ile Ser Lys

1255

1260

1265

1270

tca ggg aat gaa gga tca tac cat cat cat atc atg tgc caa gac tgt 4194

Ser Gly Asn Glu Gly Ser Tyr His His His Ile Met Cys Gln Asp Cys

1275

1280

1285

gta gtc cct gtc gaa gat gaa ttc gat gac atc cct aat gaa act cca 4242

Val Val Pro Val Glu Asp Glu Phe Asp Asp Ile Pro Asn Glu Thr Pro

1290

1295

1300

agc ata gta aag gca caa gaa gag caa tac gtc tcg ata atc aga aca 4290

Ser Ile Val Lys Ala Gln Glu Glu Gln Tyr Val Ser Ile Ile Arg Thr

1305

1310

1315

acg tta ggg tac att cat acg aag ccc agg agt gcg atg gtc ttg gag 4338

Thr Leu Gly Tyr Ile His Thr Lys Pro Arg Ser Ala Met Val Leu Glu

1320

1325

1330

gac aag agc ccc ata gga aga tac atc gag gat gtg gaa gga cac gag 4386

Asp Lys Ser Pro Ile Gly Arg Tyr Ile Glu Asp Val Glu Gly His Glu

1335 1340 1345 1350

aag gaa cta tac tca ggg gtt gtc gag tta ctg tgc tgg aaa tcc gca 4434
Lys Glu Leu Tyr Ser Gly Val Val Glu Leu Leu Cys Trp Lys Ser Ala

 1355 1360 1365

ttg gag atc tta ggt aga aca aga gac act cat gca aca gtc ggg aca 4482
Leu Glu Ile Leu Gly Arg Thr Arg Asp Thr His Ala Thr Val Gly Thr

 1370 1375 1380

gaa gac cta cag ggg tgg ccc aga ata tac gcc tat aag gtc tca aga 4530
Glu Asp Leu Gln Gly Trp Pro Arg Ile Tyr Ala Tyr Lys Val Ser Arg

 1385 1390 1395

agg cac atc ata gga aag gtg acc tca ttc atc cta tac atc ctg gca 4578
Arg His Ile Ile Gly Lys Val Thr Ser Phe Ile Leu Tyr Ile Leu Ala

 1400 1405 1410

gta caa ata gga gag ctc cct ctt cct tac agc atg gag aga gtt agc 4626
Val Gln Ile Gly Glu Leu Pro Leu Pro Tyr Ser Met Glu Arg Val Ser

1415 1420 1425 1430

cga cga gcg ata gat gta gtc tca cga gtc ggt ctt gag gga ttt tct 4674
Arg Arg Ala Ile Asp Val Val Ser Arg Val Gly Leu Glu Gly Phe Ser

 1435 1440 1445

gca gtt gcc tct ctt tgt cta ggg aga gat atc ccg atg gtg aat gat 4722

Ala Val Ala Ser Leu Cys Leu Gly Arg Asp Ile Pro Met Val Asn Asp

1450

1455

1460

gtc gtg acc atc gta gat ggg ttt gct tat cca gag act gtg tcc gtc 4770

Val Val Thr Ile Val Asp Gly Phe Ala Tyr Pro Glu Thr Val Ser Val

1465

1470

1475

tgc ctc aga tcc atc aag gca tct atc ctt atg acc ata ggc aag gtg 4818

Cys Leu Arg Ser Ile Lys Ala Ser Ile Leu Met Thr Ile Gly Lys Val

1480

1485

1490

atc aga gtg gat ggt ttc atg tcg aga agg agt gta tat ccg aca gag 4866

Ile Arg Val Asp Gly Phe Met Ser Arg Arg Ser Val Tyr Pro Thr Glu

1495

1500

1505

1510

tca atg acc tcg gac gat ttt ctg agg atc ttg gga ttc aag gct gtc 4914

Ser Met Thr Ser Asp Asp Phe Leu Arg Ile Leu Gly Phe Lys Ala Val

1515

1520

1525

atc ttc tat ggg tgc aca aag atc cac gaa aag tgc caa cta aag gga 4962

Ile Phe Tyr Gly Cys Thr Lys Ile His Glu Lys Cys Gln Leu Lys Gly

1530

1535

1540

ctt gac caa gtg acc tac gca gaa atg atg tgt cat cat aga tgt cta 5010

Leu Asp Gln Val Thr Tyr Ala Glu Met Met Cys His His Arg Cys Leu

1545 1550 1555
gag aaa ctc cta tct tcc aac ctc cta acc cac atg acc atg gac aga 5058
Glu Lys Leu Leu Ser Ser Asn Leu Leu Thr His Met Thr Met Asp Arg
1560 1565 1570
gcc atg aag tat cta ccc atc aaa atc acc aaa att ctc cct aag atc 5106
Ala Met Lys Tyr Leu Pro Ile Lys Ile Thr Lys Ile Leu Pro Lys Ile
1575 1580 1585 1590
tct tcc aca aga ccg aac aca att gcc gtg aca aga gaa gta gag act 5154
Ser Ser Thr Arg Pro Asn Thr Ile Ala Val Thr Arg Glu Val Glu Thr
1595 1600 1605
gag aat cga gag ttt tcc gac acc ttc ccc att gat gag aga gtg aca 5202
Glu Asn Arg Glu Phe Ser Asp Thr Phe Pro Ile Asp Glu Arg Val Thr
1610 1615 1620
tat cca gaa atg gat ctc aaa acc aat cag atg atc cag tat ccc aca 5250
Tyr Pro Glu Met Asp Leu Lys Thr Asn Gln Met Ile Gln Tyr Pro Thr
1625 1630 1635
tca agc ata tac aaa tgg agt gac atc ctt ctc gga att gaa cat tac 5298
Ser Ser Ile Tyr Lys Trp Ser Asp Ile Leu Leu Gly Ile Glu His Tyr
1640 1645 1650

gat cat gta gta gtc atg gga gat ggc act gga ggt aca tca atg gtt 5346
Asp His Val Val Val Met Gly Asp Gly Thr Gly Gly Thr Ser Met Val
1655 1660 1665 1670

gct gcg cac atg ttc ccg aac tcc acc ata tat cct atg gca ctc cta 5394
Ala Ala His Met Phe Pro Asn Ser Thr Ile Tyr Pro Met Ala Leu Leu
1675 1680 1685

gaa agt aag aat ctg atc cct caa gac atg gaa tca ctt gcc cct cct 5442
Glu Ser Lys Asn Leu Ile Pro Gln Asp Met Glu Ser Leu Ala Pro Pro
1690 1695 1700

atg tcc agg aag ctt aca aat gta gat tca tcc ctc ctg atc gat ctc 5490
Met Ser Arg Lys Leu Thr Asn Val Asp Ser Ser Leu Leu Ile Asp Leu
1705 1710 1715

cct gat gac atc aga aag ccc aca ttc agg act agg atg cta gag aga 5538
Pro Asp Asp Ile Arg Lys Pro Thr Phe Arg Thr Arg Met Leu Glu Arg
1720 1725 1730

gta tcg ctc atg cga gga aac att ctc atc atc tct gac att gag gga 5586
Val Ser Leu Met Arg Gly Asn Ile Leu Ile Ile Ser Asp Ile Glu Gly
1735 1740 1745 1750

act gga aca ttg ttc agg gac ata gta tcc aca tgt cta tac atg cct 5634
Thr Gly Thr Leu Phe Arg Asp Ile Val Ser Thr Cys Leu Tyr Met Pro

1755	1760	1765	
aca tca acg gat gtt ctc atg aaa aca cat cta gca gac ctc tgt gga 5682			
Thr Ser Thr Asp Val Leu Met Lys Thr His Leu Ala Asp Leu Cys Gly			
1770	1775	1780	
tca tat tac atg atg aag ggt gca gga agg att agg ctc aga ggt agt 5730			
Ser Tyr Tyr Met Met Lys Gly Ala Gly Arg Ile Arg Leu Arg Gly Ser			
1785	1790	1795	
cgg ttg gcg aac ctc aga tat gga gaa gta ttc gtc tca ttc aga gtc 5778			
Arg Leu Ala Asn Leu Arg Tyr Gly Glu Val Phe Val Ser Phe Arg Val			
1800	1805	1810	
acc gga ggg aac atc aga ccg aac aga aga ggg ctg ggg aac tgc att 5826			
Thr Gly Gly Asn Ile Arg Pro Asn Arg Arg Gly Leu Gly Asn Cys Ile			
1815	1820	1825	1830
cag gag gtg atg atc ggg ctc atg aat acc cag ata gag aca gca act 5874			
Gln Glu Val Met Ile Gly Leu Met Asn Thr Gln Ile Glu Thr Ala Thr			
1835	1840	1845	
gga atg ctc tcg cag atc gag tcc atg ttc ccc ttg gct gct gac atg 5922			
Gly Met Leu Ser Gln Ile Glu Ser Met Phe Pro Leu Ala Ala Asp Met			
1850	1855	1860	

agc atg aac ata gct atg atg aag atg gcc tca tgg gga gga tca ttc 5970

Ser Met Asn Ile Ala Met Met Lys Met Ala Ser Trp Gly Gly Ser Phe

1865

1870

1875

tcg agg aag gtt ctg gga gaa gat ggg ctc aag ctg atg gga tat gtc 6018

Ser Arg Lys Val Leu Gly Glu Asp Gly Leu Lys Leu Met Gly Tyr Val

1880

1885

1890

tac caa tac atc aat aca cac tac cat ttt gcc tca tcc tct tac agg 6066

Tyr Gln Tyr Ile Asn Thr His Tyr His Phe Ala Ser Ser Ser Tyr Arg

1895

1900

1905

1910

ccc gga gac aac aga aca gta aca cca agg aga aaa gag gat ctg acc 6114

Pro Gly Asp Asn Arg Thr Val Thr Pro Arg Arg Lys Glu Asp Leu Thr

1915

1920

1925

aag ctc ctg tgc tcc att atg ttg ggg gtt tat gga gaa gat aca gag 6162

Lys Leu Leu Cys Ser Ile Met Leu Gly Val Tyr Gly Glu Asp Thr Glu

1930

1935

1940

act att gag gaa gtg tcg aag tat acg ttg atc ggg agc aag aaa gga 6210

Thr Ile Glu Glu Val Ser Lys Tyr Thr Leu Ile Gly Ser Lys Lys Gly

1945

1950

1955

gta cca gga aag agt tac ttc aag gtt ctg atg tgg aaa act ggg acc 6258

Val Pro Gly Lys Ser Tyr Phe Lys Val Leu Met Trp Lys Thr Gly Thr

1960 1965 1970

aag aga gcc ttg gaa cac gat gag tac atg gtt ggg aga gca ata agg 6306
Lys Arg Ala Leu Glu His Asp Glu Tyr Met Val Gly Arg Ala Ile Arg

1975 1980 1985 1990

aac tac cgc acc aga att ctg gag gcc aag aaa ctg gat gga cct ata 6354
Asn Tyr Arg Thr Arg Ile Leu Glu Ala Lys Lys Leu Asp Gly Pro Ile

1995 2000 2005

gga ttg cca ttc cat agt gga tcc cta agg aag att gcc acc tgg gga 6402
Gly Leu Pro Phe His Ser Gly Ser Leu Arg Lys Ile Ala Thr Trp Gly

2010 2015 2020

tac aag att cca ata tct gca agc ggt gga tgg ata gac aat cac cta 6450
Tyr Lys Ile Pro Ile Ser Ala Ser Gly Gly Trp Ile Asp Asn His Leu

2025 2030 2035

cag atc tga ggacccttg aggatgaatg atgttgtgaa tagggagcac 6499
Gln Ile

2040

gaatgtatga gcagacgatg aataagtccc aaatattaga aaaaacgaac ccagatagct 6559

cagtgactgt taattcctgc acaggctaata ggaatcaagat atctagacaa catccaaagt 6619

cggaagtagg gaaaatatcc gagcgtgtga acattggaaa aaatcaaaga cgaaaccccc 6679

gggaataata aaacgttgga gtctcccage ccgctaaage aagttgagtt ctaacaaagc 6739

cgtgttagtc ggggtcttga tttttatgat tttgttgtgc tgtgtttgcg accg 6793

<210> 13

<211> 2040

<212> PRT

<213> Lettuce Big-vein Virus

<400> 13

Met Ser Leu Ala Ser Arg Met Thr Ser Val Gly Gly Ala Asp Asn Tyr

1 5 10 15

Gly Glu Ser Asp Tyr Gly Trp Asp Glu Thr Val Leu Gly Asp Met His

20 25 30

Leu Asn Ser Ala Ile Asn Leu Asp Leu Phe Lys Glu Phe Leu His Ile

35 40 45

Asp Pro Pro Val Tyr Lys Val Lys Glu Asn His Arg Leu Thr Glu Glu

50 55 60

Leu Arg Glu Leu Gln Ser Leu Ala Arg Lys Gly Ser Lys Ile Glu Ile

65 70 75 80

Gly Phe Gln Arg Leu Phe Ala Arg Met Phe Pro Arg Asp Gly Asn Leu

 85 90 95

Ile Pro Met Asp Ser Thr Met Thr Arg Met Ile Met Lys Ile Ile Arg

 100 105 110

Asp Ser Gly Thr Lys Tyr Lys Leu Gly Ile Pro Leu Leu Gly Ile Ser

 115 120 125

Glu Glu Met Ile Lys Lys Gly Ala Met Val Pro Ser Asn Leu Val Tyr

 130 135 140

Ser Phe Asn Cys Phe Leu Asn Ile Ile Tyr Gly Arg Ser Glu Trp Ile

145 150 155 160

Arg Ser Glu Gly Ile Ala Ile Arg Phe Lys Met Tyr Glu His Gly Arg

 165 170 175

Phe Ile Arg Arg Asp Leu Thr Ile Ser Glu Lys Glu Tyr Asn Phe Ile

 180 185 190

Val Gly Lys Glu Val Val Glu Ile Arg Ala Ser Arg Arg Lys Glu Arg

 195 200 205

Phe Ile Ala Asp Tyr Asn Ser Leu Leu Leu Leu Asp Val Ala Gly

210

215

220

Gln Arg Ile Cys Ala His Leu Cys Ser Gln Leu Gly Glu Ile Ser Gly

225

230

235

240

Val Pro Gly Ser Leu Ser Arg Tyr His Leu Glu Thr Leu Cys Thr Ala

245

250

255

Gly Asp Arg Met Ile Glu Arg Cys Gly Asn Lys Ala Tyr Glu Val Leu

260

265

270

Gly Met Tyr Glu Ala Leu Cys Val Gly Arg Leu Leu Glu Asn Asn Pro

275

280

285

Asp Gly Ile Thr Asp His Thr Gln Phe Ser Ser Asn Cys Glu Glu Glu

290

295

300

Leu Gln Glu Leu Ile Ala Gly Ser Val Glu Pro Ala Phe Met Lys Ser

305

310

315

320

Gln Val Asp Leu Ile Lys Thr Thr Leu Glu Lys Met Lys Asn Gln Asp

325

330

335

Ile Ser Asn Ala Phe Cys Leu Tyr Arg Val Trp Gly His Pro Thr Val

340

345

350

Asp Ile Tyr Glu Gly Met Lys Lys Val His Thr Ile Gly Thr Lys Val
355 360 365

Lys Val Ile Pro Pro Asn Leu Gly Thr Ile Met Val Cys Gln Phe Arg
370 375 380

Lys Met Phe Met Ala Thr Phe Phe Lys Lys His His Arg Tyr Pro Pro
385 390 395 400

Ile Thr Gly Thr Pro Gly Glu Tyr Leu Glu Arg Cys Leu Lys Asp Asn
405 410 415

Val Ala Ile Arg Ile Glu His Leu Ala Tyr Asn Leu Arg Asp Phe Glu
420 425 430

Phe Ile Arg Ile Gly Glu Thr Tyr Ser Val Pro Asp Thr Phe Asp Met
435 440 445

Cys His Val Leu Asn Asp Lys Ala Val Ser Pro Asp Met Ser Glu Leu
450 455 460

Leu Glu Ser Ile Lys Asn Gly Lys Gly Thr Ser Cys Gly Ala Lys Arg
465 470 475 480

Arg Gly Ile Leu Arg Trp Met Glu Gly Asp Ser Leu Asn Cys Lys Ser

485

490

495

Phe Leu Ser Asp Ile Asp Glu Lys Gly Leu Ser Glu Glu Asp Leu Leu

500

505

510

Ile Gly Met Tyr Glu Lys Glu Arg Glu Ile Lys Val Ala Ala Arg Met

515

520

525

Tyr Ser Leu Met Thr Glu Arg Met Arg Tyr Tyr Phe Val Leu Thr Glu

530

535

540

Gly Leu Ile Ala Asp Tyr Ile Leu Pro His Phe Pro Glu Ile Thr Met

545

550

555

560

Lys Asp Ser Leu Asn Val Leu Leu Lys Lys Met Trp Glu Ser Gly Gly

565

570

575

Gln Arg Ser Ile Gly Ser Met Asp Val Asn Ile Asn Ile Asp Phe Ser

580

585

590

Lys Trp Asn Thr Asn Met Arg Glu Gly Pro Thr Ser Asp Thr Phe Arg

595

600

605

Glu Met Asp Gly Ile Phe Gly Phe Lys Arg Leu Ile Ala Arg Thr His

610

615

620

Glu Ile Phe Asn Ala Ser Leu Val Tyr Ser Ala Ser Gly Lys Tyr Leu

625 630 635 640

Pro Thr Ile Glu Asp Gly Arg Ile Leu Asp Asp Pro Pro Met Cys Tyr

645 650 655

Arg Gly His Leu Gly Gly Phe Glu Gly Leu Arg Gln Lys Gly Trp Thr

660 665 670

Val Ala Thr Val Cys Leu Leu Ala Tyr Leu Ser Glu Gln Asn Lys Ile

675 680 685

Gln Met Lys Leu Met Gly Gln Gly Asp Asn Gln Ile Ile Arg Leu Arg

690 695 700

Met Pro Thr Ser Tyr Trp Asp Ser Leu Arg Leu Thr Glu Glu Met Lys

705 710 715 720

Lys Lys Glu Ala Arg Ile Leu Ser Asp Lys Phe Val His Glu Met Asp

725 730 735

Ile Ile Phe Thr Gly Val Gly Leu Pro Ile Lys Val Arg Glu Thr Trp

740 745 750

Lys Ser Thr Arg Leu Phe Met Tyr Gly Lys Val Met Leu Leu Asp Gly

755 760 765

Arg Gln Leu Pro Gln Trp Tyr Lys Lys Thr Leu Arg Ser Tyr Ala Leu

770

775

780

Ser Asn Glu Gly Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Ile Gly Thr Ile Ala

785

790

795

800

Thr Asn Met Cys Ala Ala Gly Gly Gly Ser Glu Val Pro Cys Val Met

805

810

815

Tyr Leu Phe Phe Leu Leu Leu Ala Glu Trp Ser Leu Glu Phe Met Phe

820

825

830

Arg Tyr His Pro Phe Thr Arg Val Gly Ile Lys Asp Gly Ser Ser Met

835

840

845

Glu Phe Arg Leu Asn Glu Lys Gly Gly Tyr Val His Lys Gln Thr Arg

850

855

860

Lys Thr Asn Asn Leu Trp Leu Lys Ser Leu Leu Val Leu Val Pro Thr

865

870

875

880

Ala Val Gly Gly Ser Val Thr Ile Pro Leu Thr Gly Phe Ile Met Arg

885

890

895

Gly Phe Pro Asp Lys Ala Ser Glu Gly Tyr Ala Trp Leu Lys Phe Leu

900

905

910

Gly Ser Ser Lys Ser Pro Ile Gln Gly Phe Leu Lys Asn Phe Tyr Thr

915

920

925

Phe Leu Pro Asn Asp Thr Val Glu Ala Asp Met Leu Val Gln Ser Pro

930

935

940

Phe Ser Leu Thr His Lys Arg Pro Pro Thr Pro Gly Leu Gln Thr Lys

945

950

955

960

Glu Asn Ile Arg Glu Trp Leu Leu Ser Thr Pro Arg Phe Gln Gln Asn

965

970

975

Arg Phe Ile Arg Ser Met Gln Val Leu Leu Ser Gly Phe Asp Lys Lys

980

985

990

Ser Val Cys Arg Glu Leu Leu Thr Glu Arg Met Asn Pro Leu Ile Ser

995

1000

1005

His Glu Val Tyr Glu Thr Phe Gly His Val Tyr Cys Glu Gly Ile Val

1010

1015

1020

Ala Arg Val Glu Asn Thr Arg Thr Ile Arg Thr Leu His Leu Ser Arg

1025

1030

1035

1040

Glu Asp Arg Lys Pro Ile Val Ala Lys Leu Met Thr Asp Glu Met Ala

1045

1050

1055

Tyr Ile Ala Tyr Met Trp Trp Arg Gly Asn Thr Lys Gly Glu Val Phe

1060

1065

1070

Glu Glu Cys Ala Thr Lys Gln Ala Arg Lys Gly Arg Asn Val Gly Trp

1075

1080

1085

Lys Arg Glu Ile Val Gly Ile Thr Thr Pro His Pro Leu Glu Val Leu

1090

1095

1100

Phe Gln Ser Val Cys Arg Pro Gly Asp Gln Cys Gln Arg Ser Asp Asp

1105

1110

1115

1120

Tyr Ile Thr Ser Lys Leu Val Asp Asp Gly Lys Phe Pro Pro Phe Leu

1125

1130

1135

Gly Ser Lys Ile Lys Asn Lys Val Tyr Ser Leu Gln Asp Glu Glu Ala

1140

1145

1150

Arg Arg Glu Pro Leu Ile Lys Thr Gly Ala Arg Leu Ala Arg Gln Phe

1155

1160

1165

Asn Trp Ile Gly Met Gly Glu Asn Met Arg Gly Leu Val Leu Lys Asn

1170

1175

1180

Val Gly Ser Ile Cys Asp Val Ser Val Phe Asp Lys Phe Val Asp Asp

1185 1190 1195 1200

Asp Pro Ser Asp Asn Leu Tyr Thr Gly Ser Leu Met His Arg Phe Thr

 1205 1210 1215

Pro Ser Ser Val Ser Glu Gly Cys Phe Ile Asn Tyr Ala Pro Gln Val

 1220 1225 1230

Gly His Lys Val Phe Met Ser Ser Asp Thr Leu Pro Ser Leu Ser Arg

 1235 1240 1245

Gly Gln Thr Asn Tyr Thr Phe His Phe Gln Ala Met Tyr Cys Phe Leu

 1250 1255 1260

Gln Tyr Ser Ile Ser Lys Ser Gly Asn Glu Gly Ser Tyr His His His

1265 1270 1275 1280

Ile Met Cys Gln Asp Cys Val Val Pro Val Glu Asp Glu Phe Asp Asp

 1285 1290 1295

Ile Pro Asn Glu Thr Pro Ser Ile Val Lys Ala Gln Glu Glu Gln Tyr

 1300 1305 1310

Val Ser Ile Ile Arg Thr Thr Leu Gly Tyr Ile His Thr Lys Pro Arg

1315

1320

1325

Ser Ala Met Val Leu Glu Asp Lys Ser Pro Ile Gly Arg Tyr Ile Glu

1330

1335

1340

Asp Val Glu Gly His Glu Lys Glu Leu Tyr Ser Gly Val Val Glu Leu

1345

1350

1355

1360

Leu Cys Trp Lys Ser Ala Leu Glu Ile Leu Gly Arg Thr Arg Asp Thr

1365

1370

1375

His Ala Thr Val Gly Thr Glu Asp Leu Gln Gly Trp Pro Arg Ile Tyr

1380

1385

1390

Ala Tyr Lys Val Ser Arg Arg His Ile Ile Gly Lys Val Thr Ser Phe

1395

1400

1405

Ile Leu Tyr Ile Leu Ala Val Gln Ile Gly Glu Leu Pro Leu Pro Tyr

1410

1415

1420

Ser Met Glu Arg Val Ser Arg Arg Ala Ile Asp Val Val Ser Arg Val

1425

1430

1435

1440

Gly Leu Glu Gly Phe Ser Ala Val Ala Ser Leu Cys Leu Gly Arg Asp

1445

1450

1455

Ile Pro Met Val Asn Asp Val Val Thr Ile Val Asp Gly Phe Ala Tyr

1460

1465

1470

Pro Glu Thr Val Ser Val Cys Leu Arg Ser Ile Lys Ala Ser Ile Leu

1475

1480

1485

Met Thr Ile Gly Lys Val Ile Arg Val Asp Gly Phe Met Ser Arg Arg

1490

1495

1500

Ser Val Tyr Pro Thr Glu Ser Met Thr Ser Asp Asp Phe Leu Arg Ile

1505

1510

1515

1520

Leu Gly Phe Lys Ala Val Ile Phe Tyr Gly Cys Thr Lys Ile His Glu

1525

1530

1535

Lys Cys Gln Leu Lys Gly Leu Asp Gln Val Thr Tyr Ala Glu Met Met

1540

1545

1550

Cys His His Arg Cys Leu Glu Lys Leu Leu Ser Ser Asn Leu Leu Thr

1555

1560

1565

His Met Thr Met Asp Arg Ala Met Lys Tyr Leu Pro Ile Lys Ile Thr

1570

1575

1580

Lys Ile Leu Pro Lys Ile Ser Ser Thr Arg Pro Asn Thr Ile Ala Val

1585

1590

1595

1600

Thr Arg Glu Val Glu Thr Glu Asn Arg Glu Phe Ser Asp Thr Phe Pro

1605

1610

1615

Ile Asp Glu Arg Val Thr Tyr Pro Glu Met Asp Leu Lys Thr Asn Gln

1620

1625

1630

Met Ile Gln Tyr Pro Thr Ser Ser Ile Tyr Lys Trp Ser Asp Ile Leu

1635

1640

1645

Leu Gly Ile Glu His Tyr Asp His Val Val Val Met Gly Asp Gly Thr

1650

1655

1660

Gly Gly Thr Ser Met Val Ala Ala His Met Phe Pro Asn Ser Thr Ile

1665

1670

1675

1680

Tyr Pro Met Ala Leu Leu Glu Ser Lys Asn Leu Ile Pro Gln Asp Met

1685

1690

1695

Glu Ser Leu Ala Pro Pro Met Ser Arg Lys Leu Thr Asn Val Asp Ser

1700

1705

1710

Ser Leu Leu Ile Asp Leu Pro Asp Asp Ile Arg Lys Pro Thr Phe Arg .

1715

1720

1725

Thr Arg Met Leu Glu Arg Val Ser Leu Met Arg Gly Asn Ile Leu Ile

1730	1735	1740	
Ile Ser Asp Ile Glu Gly Thr Gly Thr Leu Phe Arg Asp Ile Val Ser			
1745	1750	1755	1760
Thr Cys Leu Tyr Met Pro Thr Ser Thr Asp Val Leu Met Lys Thr His			
	1765	1770	1775
Leu Ala Asp Leu Cys Gly Ser Tyr Tyr Met Met Lys Gly Ala Gly Arg			
	1780	1785	1790
Ile Arg Leu Arg Gly Ser Arg Leu Ala Asn Leu Arg Tyr Gly Glu Val			
	1795	1800	1805
Phe Val Ser Phe Arg Val Thr Gly Gly Asn Ile Arg Pro Asn Arg Arg			
	1810	1815	1820
Gly Leu Gly Asn Cys Ile Gln Glu Val Met Ile Gly Leu Met Asn Thr			
1825	1830	1835	1840
Gln Ile Glu Thr Ala Thr Gly Met Leu Ser Gln Ile Glu Ser Met Phe			
	1845	1850	1855
Pro Leu Ala Ala Asp Met Ser Met Asn Ile Ala Met Met Lys Met Ala			
	1860	1865	1870

Ser Trp Gly Gly Ser Phe Ser Arg Lys Val Leu Gly Glu Asp Gly Leu

1875

1880

1885

Lys Leu Met Gly Tyr Val Tyr Gln Tyr Ile Asn Thr His Tyr His Phe

1890

1895

1900

Ala Ser Ser Ser Tyr Arg Pro Gly Asp Asn Arg Thr Val Thr Pro Arg

1905

1910

1915

1920

Arg Lys Glu Asp Leu Thr Lys Leu Leu Cys Ser Ile Met Leu Gly Val

1925

1930

1935

Tyr Gly Glu Asp Thr Glu Thr Ile Glu Glu Val Ser Lys Tyr Thr Leu

1940

1945

1950

Ile Gly Ser Lys Lys Gly Val Pro Gly Lys Ser Tyr Phe Lys Val Leu

1955

1960

1965

Met Trp Lys Thr Gly Thr Lys Arg Ala Leu Glu His Asp Glu Tyr Met

1970

1975

1980

Val Gly Arg Ala Ile Arg Asn Tyr Arg Thr Arg Ile Leu Glu Ala Lys

1985

1990

1995

2000

Lys Leu Asp Gly Pro Ile Gly Leu Pro Phe His Ser Gly Ser Leu Arg

2005

2010

2015

Lys Ile Ala Thr Trp Gly Tyr Lys Ile Pro Ile Ser Ala Ser Gly Gly

2020

2025

2030

Trp Ile Asp Asn His Leu Gln Ile

2035

2040

<210> 14

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(26)

<223> "n" indicates a or g or c or t.

<400> 14

gccggagctc tgcagaattc nnnnnn

26

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 15

gccggagctc tgcagaattc

20

<210> 16

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 16

agctctgaac aacgacatg

19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/04268

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/40, C07K14/08, C07K16/10, C12N5/10, C12P21/02, A01H5/00,
C12Q1/68, G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/40, C07K14/08, C07K16/10, C12N5/10, C12P21/02, A01H5/00,
C12Q1/68, G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
EX	SASAKI T. et al., "Nucleotide sequence of the coat protein gene of <i>Lettuce big-vein virus</i> ", Journal of General Virology, June, 2001, Vol.82, pages 1509 to 1515	1-17
PA	ROGGERO P. et al., "An <i>Ophiovirus</i> isolated from lettuce with big-vein symptoms", Arch Virol., (2000), Vol. 145, pages 2629 to 2642	1-17
A	BAULCOMBE D. C., "Mechanisms of Pathogen-Derived Resistance to Viruses in Transgenic Plants", The Plant Cell, October, 1996, Vol.8, pages 1833 to 1844	1-17

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
10 August, 2001 (10.08.01)

Date of mailing of the international search report
21 August, 2001 (21.08.01)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1⁷ C12N15/40, C07K14/08, C07K16/10, C12N5/10,
C12P21/02, A01H5/00, C12Q1/68, G01N33/50

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1⁷ C12N15/40, C07K14/08, C07K16/10, C12N5/10,
C12P21/02, A01H5/00, C12Q1/68, G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq,
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
EX	SASAKI T. et al. Nucleotide sequence of the coat protein gene of <i>Lettuce big-vein virus</i> . Journal of General Virology. June 2001, Vol. 82, p. 1509-1515	1-17
PA	ROGGERO P. et al. An <i>Ophiovirus</i> isolated from lettuce with big-vein symptoms. Arch Virol. 2000, Vol. 145, p. 2629-2642	1-17
A	BAULCOMBE D. C. Mechanisms of Pathogen-Derived Resistance to Viruses in Transgenic Plants. The Plant Cell. October 1996, Vol. 8, p. 1833-1844	1-17

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10.08.01

国際調査報告の発送日

21.08.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

本間 夏子



4N 9637

電話番号 03-3581-1101 内線 3488